

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und Medizinische  
Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.-D. Klenk  
Institut für Virologie Leiter: Prof. Dr. med. H.-D. Klenk  
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg  
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg



---

# **Untersuchung zur Serodiagnostik von Cox B – Viren**

## **Ein Methodenvergleich**

INAUGURAL- DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von

Alireza Sina  
aus Naragh

Marburg 2005

---

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 24.11.2005  
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan:	Prof. Dr. B. Maisch
Referent:	Prof. Dr. W. Slenczka
Korreferent:	Prof. Dr. R. Mengel

Für Saideh, Nick und Ava

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1	Taxonomie der Coxsackieviren .....	8
1.2	Historisches .....	9
1.3	Morphologie der Coxsackie-B-Viren (CBV) .....	10
1.4	Pathomechanismen der CBV-Infektion .....	11
1.5	Epidemiologie.....	12
1.6	Klinisches Bild der Coxsackievirusinfektion .....	16
1.6.1	CVB-typische Erkrankungen.....	17
1.6.1.1	Myositis epidemica (Bornholmer Krankheit).....	17
1.6.1.2	Myokarditis.....	18
1.6.1.3	Aseptische Meningitis .....	20
1.7	Diagnostik.....	21
1.8	Problemstellung und Ziel der Arbeit .....	24
<b>2</b>	<b>Methodik.....</b>	<b>26</b>
2.1	Untersuchungsmaterial .....	26
2.2	ELISA.....	28
2.2.1	Durchführung der Tests .....	29
2.3	Neutralisationstest (NT) .....	30
2.3.1	Testprinzip.....	30
2.3.2	Testdurchführung .....	32
2.4	Statistik .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	Ergebnisse ELISA .....	36
3.1.1	Gesamtergebnis .....	36
3.1.2	Immunglobulinspezifische Ergebnisse .....	37

3.1.2.1	ELISA-IgA .....	37
3.1.2.2	ELISA-IgG .....	38
3.1.2.3	ELISA-IgM.....	38
3.1.2.4	Zusammenfassung (IgA, IgG, IgM) .....	39
3.1.3	ELISA nach Altergruppen .....	40
3.1.3.1	Positive Seren (IgA, IgG und IgM) und seropositive Patienten .....	40
3.1.3.2	Positive Seren (nur IgA) .....	43
3.1.3.3	Positive Seren (nur IgM) .....	44
3.1.3.4	Positive Seren (nur IgG) .....	45
3.2	Ergebnisse Neutralisationstest (NT).....	46
3.2.1	Gesamtergebnis .....	46
3.2.2	NT nach Antigentyp .....	47
3.2.3	NT nach Altersgruppen .....	49
3.2.3.1	Seropositive Patienten (B1, B2, B3, B4 oder B5) .....	49
3.2.3.2	Positive Seren nach Antigentyp.....	51
3.2.3.3	Cox-B1 .....	52
3.2.3.4	Cox-B2 .....	53
3.2.3.5	Cox-B3 .....	54
3.2.3.6	Cox-B4 .....	55
3.2.3.7	Cox-B5 .....	56
3.2.4	NT nach Titer.....	57
3.3	Übereinstimmungen ELISA und NT (Grenztiter=80).....	60
3.3.1	Gesamtergebnis: ELISA (gesamt) und NT (gesamt).....	61
3.3.2	ELISA (IgA) und NT (gesamt).....	64
3.3.3	ELISA (IgG) und NT (gesamt).....	66
3.3.4	ELISA (IgM) und NT (gesamt).....	68
3.4	Übereinstimmungen ELISA und NT (Grenztiter=160).....	70
3.4.1	Gesamtergebnis: ELISA und NT.....	72
3.5	Übereinstimmungen ELISA und NT (versch. Grenztiter).....	74
3.6	ELISA-Ergebnisse in Abhängigkeit vom NT-Titer.....	75
3.6.1	ELISA (gesamt).....	75
3.6.2	ELISA (IgA) .....	77

3.6.3	ELISA (IgG).....	78
3.6.4	ELISA (IgM) .....	80
3.6.5	Einzelergebnisse im Vergleich .....	81
3.7	Sensitivität und Spezifität des ELISA-Tests .....	83
3.7.1	NT-Grenztiter = 80 als "wahre" Größe.....	83
3.7.2	Empfindlichkeit des ELISA in Abhängigkeit vom NT-Titer .....	85
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>87</b>
4.1	Methodik.....	87
4.2	Ergebnisse.....	88
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>105</b>
7.1	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer.....	106
7.2	Danksagung.....	107

**Abkürzungsverzeichnis**

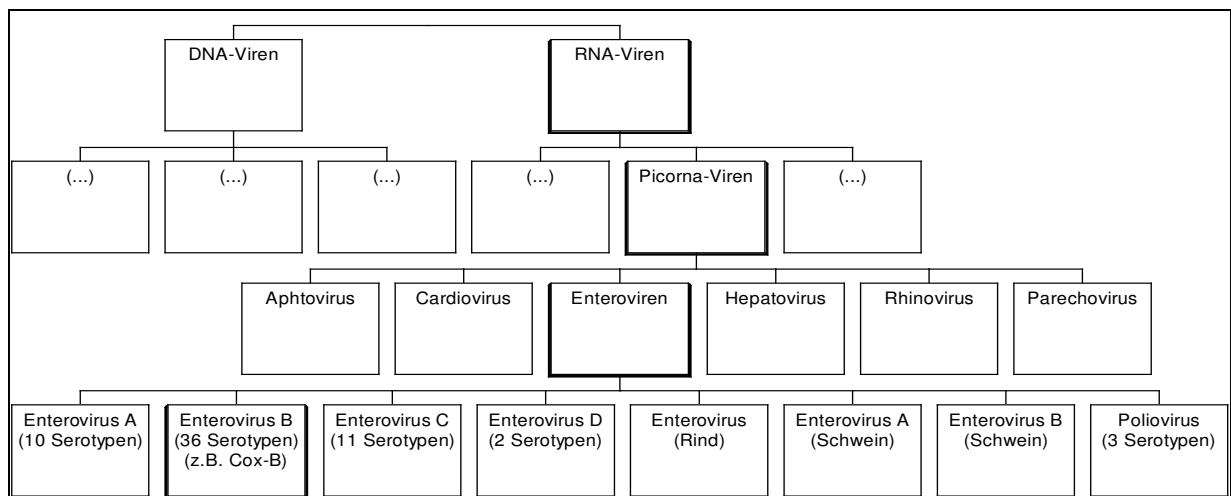
AK	Antikörper
CAV	Coxsackie-A-Virus
CBV	Coxsackie-B-Virus
Cox	Coxsackie-Virus
CPE	Cytopathischer Effekt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylendiamintetra Acidic Acid
EV	Enterovirus
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
MRNA	Messenger RNA
NT	Neutralisationstest
OD-Werte	Optische Dichte (optical density)
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
VP	Virusprotein

# Einleitung

## 1.1 Taxonomie der Coxsackieviren

Coxsackieviren gehören, zusammen mit Polio- und Echoviren, zur Gruppe der Enteroviren. Enteroviren wiederum gehören zur Familie der Picornaviren. Bisher sind 66 immunologisch verschiedenartige humanpathogene Enteroviren bekannt (Muir et al. 1998). Die moderne Klassifikation unterteilt die Picornaviren in sechs Untergruppen. Eine dieser Untergruppen ist die Gruppe der Enteroviren, die wiederum in acht Subgruppen unterteilt ist (Racaniello, 2001) (Abb. 1).

**Abb. 1:** Virentypen - Vereinfachte schematische Darstellung (nach van Regenmortel et al. 2000)



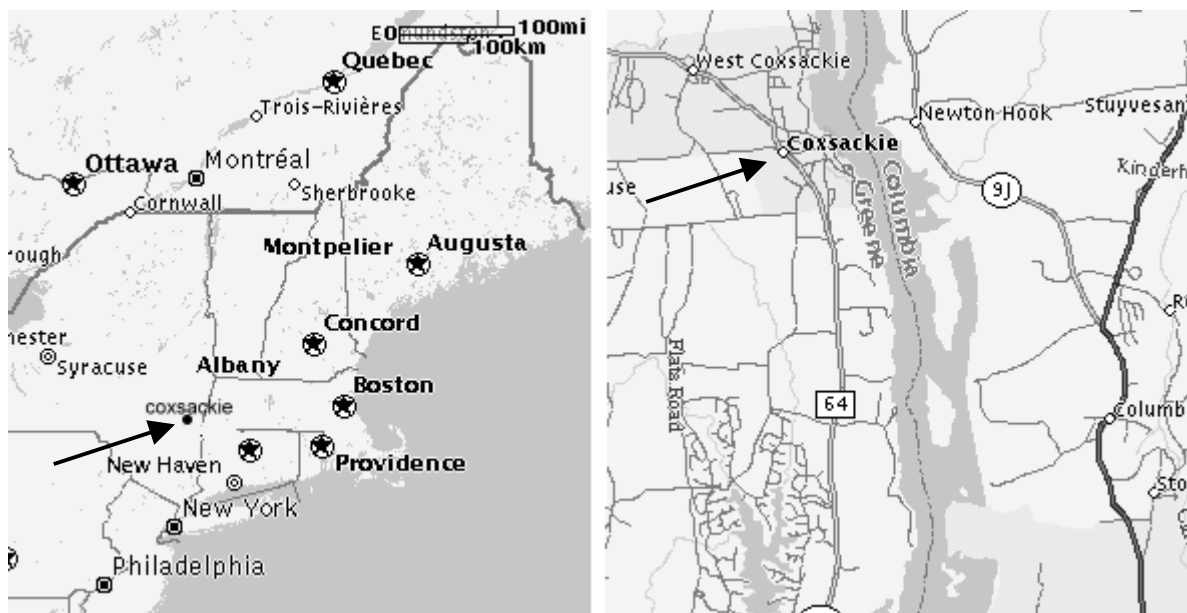
Coxsackieviren bzw. die anderen Vertreter dieser Familie zählen mit einem Durchmesser von 25-30 nm mit zu den kleinsten Viren; kleiner sind lediglich noch die Parvoviren mit einem Durchmesser von 18-24 nm. Aus dem Umstand, dass es sich bei den Coxsackieviren um sog. RNA-Viren handelt leitet sich der Name dieser Virenfamilie (Picorna) ab, der ein Akronym aus den Termini pico (klein) und RNA ist (Racaniello, 2001).



## 1.2 Historisches

Benannt wurden die Cocksackieviren nach der Stadt (Cocksackie, New York, USA) in der sie erstmalig entdeckt wurden (Abb. 2). Im Rahmen ihrer Poliomyelitis-Studien isolierten Julius Gilbert Dalldorf und Grace Sickles im Jahre 1948 ein Filtrat aus dem Stuhl von Poliomyelitispatienten, welches überraschenderweise bei neugeborenen Mäusen eine Paralyse verursachte, was im Widerspruch zu der Beobachtung stand, dass eine Poliomyelitis nur bei Primaten induziert werden kann. Schließlich stellte es sich heraus, dass es sich bei diesem Filtrat um einen neuen Virentyp handeln musste, nämlich das Cocksackievirus (Dalldorf und Sickles, 1948; Dalldorf et al. 1949).

**Abb. 2:** Cocksackie, New York, USA (Geografische Lage).



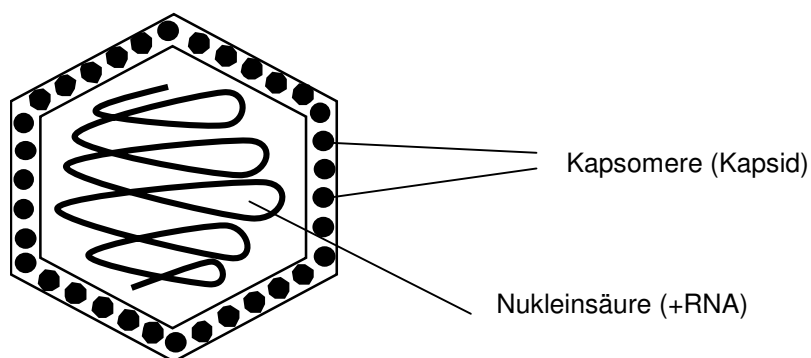
Es wurden bisher 23 Cocksackie-A-Virus (CAV)-Serotypen [1-22 und 24; CAV-23 wurde den ECHO-Viren zugeordnet] und sechs Cocksackie-B-Virus (CBV)-Serotypen [1-6] entdeckt (Hyppiä et al. 1997). Die Einteilung der Cocksackieviren in A- und B-Serotypen erfolgte anhand der Krankheitsmerkmale und der histopathologischen Läsionen, welche nach Inokulation bei neugeborenen Mäusen zu beobachten waren (Santti et al. 2000). Seit dem Jahr 1970 werden neu entdeckte Enteroviren nicht mehr den Cocksackieviren

bzw. einer der beiden anderen Gruppen zugeordnet, sondern werden als Enteroviren (ENV) fortlaufend durchnummeriert (Minor et al. 1995).

### 1.3 Morphologie der Coxsackie-B-Viren (CBV)

Es handelt sich beim Coxsackie-B-Virus (CBV), wie auch bei den anderen Picornaviren, um einfach aufgebaute Virionen, die nur aus Proteinhülle (Kapsid) und Genom bestehen, wobei es sich beim Genom um einzelsträngige RNA handelt (Abb. 3). CBV sind, wie alle Enteroviren, gegenüber äußeren Einflüssen im Allgemeinen sehr stabil, lassen sich jedoch durch Hitze, Austrocknung, UV-Strahlung sowie chlor- und formalinhaltige Desinfektionsmittel inaktivieren (Rueckert, 1990). Da die Picornaviren keine Lipidhülle besitzen, sind sie unempfindlich gegenüber organischen Lösungsmitteln. Enteroviren, zu denen ja auch die Coxsackieviren gehören, sind darüber hinaus relativ säureresistent; sie sind unempfindlich gegenüber pH-Werten von drei und niedriger (Racaniello, 2001).

**Abb. 3:** Strukturmodell eines Picornavirus (nacktes, dodekaedrisches Nukleokapsid)



Das Nukleokapsid der Picorna- bzw. Coxsackieviren weist die Form eines Dodekaeders auf (Dunker et al. 1971). Das Kapsid der Coxsackieviren, welches nicht umhüllt („nackt“) ist, trägt die antigenwirksamen Bestandteile. Es wird aus vier verschiedenen Strukturproteinen (VP1 bis VP4) aufgebaut (Chatterjee und Tuchowski, 1981), wobei VP1 das Polypeptid ist, welches den Hauptanteil an gruppen- und typenspezifischen

Antigendeterminanten trägt (Doerries und Ter Meulen, 1983; Mertens et al. 1983; Katze und Crowell, 1980). Diese Strukturen, auch Epitope genannt, sind für die Entwicklung der humoralen Immunantwort im Laufe einer CBV-Infektion verantwortlich (Doerries und Ter Meulen, 1983). Gleichzeitig befinden sich auf dieser Ebene Liganden für Zellrezeptoren, deren Anzahl und Struktur den Wirtsbereich des Virus bestimmen (Putnack und Phillips, 1981; Philipson et al. 1973).

Das Genom ist eine 7,2 Kilobasen lange polyadenylierte RNA-Einzelstrangkette positiver Polarität (+RNA). Diese RNA, die ein offenes Leseraster mit Nicht-Kodierungssequenzen am 5'- und 3'-Ende als Regulierungselemente aufweist, dient sowohl als Matrix für die Synthese neuer Genome, als auch als mRNA für die Synthese neuer Proteine (Rueckert, 1990).

## **1.4 Pathomechanismen der CBV-Infektion**

Das Wirtsspektrum ist, abgesehen von den Gattungen Maus und Affe, auf den Menschen beschränkt. In Abhängigkeit vom Virenstamm können im Verlaufe einer Infektion bestimmte Organe besiedelt bzw. angegriffen werden. Außer von der Art des Virenstammes oder von dessen Varianten ist die Pathogenität auch von den genetischen Eigenschaften des Wirtes abhängig (Ramsingh et al. 1990).

Die Infektion der Zielzellen ist abhängig von der Fähigkeit der Viren an der Zelloberfläche anzudocken. Diese Bindung findet an spezifischen Rezeptoren statt. In Abhängigkeit vom Virentyp können dies mehrere Rezeptoren sein. So benutzen die Coxsackie-B-Viren sowohl Coxsackievirus- als auch Adenovirusrezeptoren um an die Zielzellen anzudocken (Kuhn, 1997).

Die Eintrittspforte der CBV ist, wie bei allen Enteroviren, der Gastrointestinaltrakt. Die Virusvermehrung findet wahrscheinlich im lymphatischen Gewebe des Rachenraumes und des Darmes statt und führt zunächst zu einer klinisch meist nicht nachweisbaren

Virämie. Von dort aus, über die Blutbahn, erreichen die Virionen ihre Zielorgane, in welchen ein weiterer Replikationszyklus erfolgt und eine kontinuierliche Virusproduktion stattfindet, was schließlich in der klinischen Symptomatik resultiert (Rueckert et al. 1990; Rotbart und Hayden, 2000).

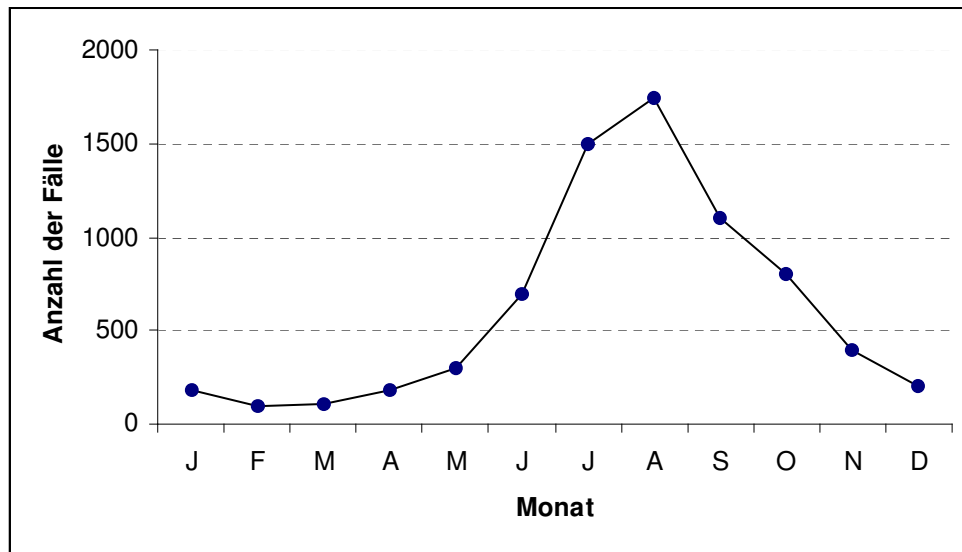
## **1.5 Epidemiologie**

Coxsackie-B-Viren (CBV) sind, wie alle Enteroviren, ubiquitär verbreitet. Die Virusübertragung erfolgt hauptsächlich durch Schmierinfektion (fäkal-oral), jedoch ist auch eine Tröpfcheninfektion möglich. Das Trinkwasser spielt oft eine wichtige Rolle als Auslöser von Epidemien (Assaad und Cockburn, 1972; Melnick et al. 1996).

Coxsackievirusinfektionen sind auch via plazentarer Übertragung möglich (Basso et al. 1990). Die meisten neonatalen Infektionen dürften jedoch vermutlich auf dem üblichen Weg stattfinden (Abzug, 2004).

Coxsackievirusinfektionen treten, wie alle Enterovirusinfektionen, überwiegend in den Sommermonaten einschließlich Frühherbst auf und sind in der Zeit von November bis Mai nur sporadisch zu beobachten (Assaad und Borecka, 1977). In der grafischen Darstellung sind die jahreszeitlichen Schwankungen deutlich zu erkennen (Abb. 4).

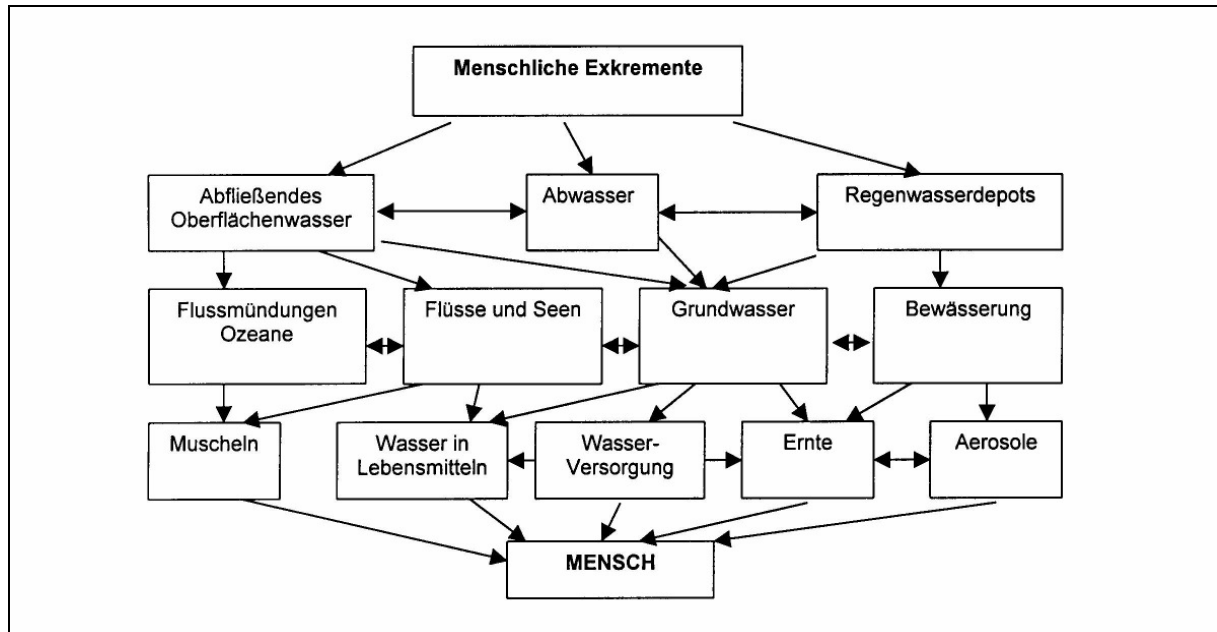
**Abb. 4:** Jahreszeitliche Verteilung der Coxsackie-Infektionen in Europa und den USA im Zeitraum von 1967-1976 nach Assaad und Borecka (1977).



Die Ursache für diese Schwankungen ergibt sich aus dem Umstand, dass es sich überwiegend um Schmierinfektionen handelt und beim Übertragungsweg das Wasser eine bedeutende Rolle spielen dürfte (Assaad und Cockburn, 1972). Während der Epidemiephasen sind vor allem Abfall und ungeklärte Abwässer Reservoir für infektiöse Enteroviren, wobei auch Fliegen als Überträger fungieren können. Obgleich in Insekten eine Virusvermehrung nicht stattfinden kann, ist dennoch eine wochenlange Persistenz der Viren möglich. Das Vorkommen der Enteroviren ist in den Sommermonaten im Abwasser, im Vergleich zu den kälteren Monaten, um ein vielfaches erhöht (Metcalf et al. 1995). Auch in natürlichen Gewässern finden sich gelegentlich gesundheitlich relevante Konzentrationen von Enteroviren. Das Fehlen der Lipidhülle bedingt bei dieser Virenart eine große Stabilität, so dass diese für Wochen und Monate in der Umwelt bzw. im Wasser überleben können. Dabei ist die erregerabhängige Infektionsdosis sehr gering und wird mit 1-10 infektiösen Einheiten (PFU, MPN) angegeben. Bei Untersuchungen von Oberflächenwässern in Baden-Württemberg fanden sich interessanterweise in fließenden Gewässern höhere Keimkonzentrationen als in stehenden Gewässern. Eine Chlorierung des Wassers wird als nicht ausreichende Maßnahme betrachtet, wohingegen sich die Filtrierung als sehr geeignetes Mittel zur Wasseraufbereitung erwiesen hat (Kimmig und Fleischer, 2001).

Die Bedeutung des Wassers und der Wasserkreisläufe bei der Epidemiologie von Enterovirusinfektionen geht auch aus der folgenden Abbildung hervor (Abb. 5).

**Abb. 5:** Verbreitungswege von Enteroviren in der Umwelt (nach Melnick, 1996).



Das „National Enterovirus Surveillance System (NESS)“ erfasst klinisch relevante Enterovirus (EV)-Infektionen in den USA. Wie aus den Daten der Jahre 2000 und 2001 zu erkennen ist, nehmen zum Einen die CVB-Infektionen anteilmäßig eine bedeutende Rolle ein und zum Anderen unterliegt die Frequenz einzelner Serotypen deutlichen Schwankungen. So wurden zum Beispiel im Jahr 2000 mit einem Anteil von 34,4 Prozent am häufigsten CVB-5-Infektionen diagnostiziert bzw. gemeldet; ein Jahr später lag der Anteil nur noch bei 1,7 Prozent (Tab. 1) (MMWR, 2002).

Im Zeitraum von 1970 bis 1979 wurden in den USA im Rahmen einer nationalen Erhebung bei 18.000 Patienten Enteroviren isoliert. Der Anteil der Coxsackie-B-Viren (B1-B5) lag bei 24 Prozent (Moore et al. 1984).

**Tab. 1:** Frequenz der 10 meist berichteten Non-Polio-Enteroviren nach den Daten von „National Enterovirus Surveillance System (NESS)“, USA. (MMWR, 2002)

Rang	2000		2001	
	Serotyp	Häufigkeit (%)	Serotyp	Häufigkeit (%)
1	CVB-5	34,4	ECHO 18	30,8
2	ECHO 6	8,8	ECHO 13	29,3
3	CVA-9	8,7	CVB-2	7,6
4	CVB-4	8,3	ECHO 6	4,8
5	ECHO 11	6,9	ECHO 4	4,1
6	ECHO 9	6,2	ECHO 11	3,4
7	CVB-2	3,5	CVB-3	3,0
8	ECHO 25	2,6	CVB-1	2,7
9	ECHO 18	2,3	ECHO 9	2,0
10	EV-71	2,1	CVA-9	2,0

CVB=Coxsackie-B-Virus ; CVA=Coxsackie-A-Virus ; EV=Enterovirus

Obwohl alle Altersgruppen betroffen sind, treten Coxsackie bzw. Enterovirusinfektionen bevorzugt bei Kleinkindern in Erscheinung (Stalkup und Chilukuri, 2002). In einer groß angelegten Erhebung in den USA waren fast die Hälfte alle Infizierten weniger als fünf Jahre alt, wobei innerhalb dieser Gruppe Kinder im Alter bis zu einem Jahr den größten Anteil stellten (Moore et al. 1984). Die Inzidenz scheint sich umgekehrt proportional zum Alter der Patienten zu verhalten, was bedeutet, dass mit zunehmendem Alter die Häufigkeit der Infektionen abnimmt (Stalkup und Chirukuri, 2002).

Die Inkubationszeit beträgt in der Regel 2-7 Tage, wobei diese Zahlen mit 2-35 Tagen einer großen Streubreite unterliegen. Die Übertragbarkeit ist in der frühen Phase der Infektion am größten, da das Virus dann auch in sehr hohen Konzentrationen ausgeschieden wird. Dies ist insofern von epidemiologischer Bedeutung, als dass infizierte Personen bzw. Virenausscheider die primären Infektionsquellen darstellen (Melnick, 1996). Dabei können Infizierte Personen über Monate nachweisbare Mengen an Viren mit dem Stuhl ausscheiden, wobei der Patient während dieses Zeitraumes als infektiös zu betrachten ist (Melnick, 1996; Grist et al. 1978).

Die Prävalenz von CVB-Antikörpern in der Bevölkerung ist groß und korreliert mit dem hygienischen Standard, wobei auch in Ländern mit guten hygienischen Bedingungen die Durchseuchung frühzeitig einsetzt. Mit Eintritt in das Erwachsenenalter weisen bereits ca. 80 Prozent der Bevölkerung Antikörper gegen mindestens einem CBV-Serotypen auf (Steinmann und Ullmann, 1981).

## **1.6 Klinisches Bild der Coxsackievirusinfektion**

Die meisten Infektionen verlaufen asymptomatisch, wobei Kleinkinder oft mit unspezifischem Fieber reagieren. Wenn die Infektion in Erscheinung tritt, ist meist ein blander Verlauf im Sinne einer Sommergrippe zu beobachten, der durch eher unspezifische Symptome wie Fieber, allgemeine Erschöpfung, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Durchfall und respiratorische Beschwerden gekennzeichnet ist (Rotbart und Hayden, 2000). Daneben sind Coxsackievirusinfektionen (CVA und CVB) verantwortlich für ein breites Spektrum akuter Symptome, wobei es zu Affektionen von Herz, Skelettmuskel, Zentralsnervensystem, Pankreas, Haut und Schleimhäuten kommen kann (Santti et al. 2000; Pallansch und Roos, 2001) (Tab. 2). Im Zusammenhang mit einer CBV-Infektion wurde über Erkrankungen berichtet wie Pankreatitis, Diabetes Mellitus Typ I, Myokarditis, aseptische Meningitis und Myositis (Grist et al. 1978; Pallansch und Roos, 2001). Treten CVB-Infektionen bei Neugeborenen auf, können oft schwerwiegende Krankheitsverläufe beobachtet werden, die nicht selten mit dem Bild eines Multiorganversagens einhergehen. Dies gilt vor allem für Infektionen, die innerhalb der ersten beiden Wochen post partum auftreten (Abzug, 2004).



**Tab. 2:** Klinische Manifestationen der Coxsackievirus-Infektion nach Muir et al. (1998)

Erkrankung / Syndrom	Serotyp
Paralytische Poliomyelitis	CAV-7
Aseptische Meningitis / Meningoenzephalitis	CAV und CBV
Akute Myokarditis	CBV
Bornholm Erkrankung (Pleurodynie; Myalgia acuta epidemica)	CBV
Hand-Fuß-Mundkrankheit	CAV-16
Herpangina	CAV und CBV
Exanthem	CAV und CBV
Neonatales Multiorgansyndrom	CBV
Grippale Infekte / Unspezifische respiratorische Erkrankungen	CAV und CBV

CAV=Coxsackievirus A ; CBV=Coxsackievirus B

### 1.6.1 CVB-typische Erkrankungen

#### 1.6.1.1 Myositis epidemica (Bornholmer Krankheit)

Die Myositis epidemica (epidemische Pleurodynie) kann in jedem Lebensalter auftreten, ist aber bei Kindern am häufigsten. Sie ist durch plötzliche, schwere, oft intermittierende (häufig pleuritische) Schmerzen im Epigastrium und im unteren Thorax sowie durch Fieber, Kopfschmerzen, Halsschmerzen und Unwohlsein gekennzeichnet. Lokale Berührungsempfindlichkeit, Hyperästhesie, Muskelschwellung und Myalgien von Stamm und Extremitäten können vorkommen. Die Erkrankung bessert sich meist spontan nach 2-4 Tagen, wobei auch Rezidive auftreten können; bisweilen können die Symptome über Wochen anhalten. Die Labordiagnose besteht aus der Isolierung des Virus aus Rachenspülsekret oder Stuhl sowie dem Nachweis des Anstiegs spezifischer neutralisierender Antikörpertiter. Die Prognose ist im Allgemeinen gut<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Quelle: MSD-Manual 6.Auflage. Urban & Fischer. Infektionen des Kindesalters - Enteroviruskrankheiten

Die Erkrankung, deren Leitsymptome hohes Fieber und heftige Muskelschmerzen sind, betrifft meist ältere Kinder und wird von den Serotypen CVB-1 bis CVB-5 ausgelöst (Murray, 1988).

#### 1.6.1.2 Myokarditis

Coxsackieviren (und andere Enteroviren) können relativ häufig eine Myokarditis verursachen (Grist et al. 1978). Typischerweise betroffen sind hiervon Patienten im Alter zwischen 20 und 40 Jahren (Woodruff, 1980). Die Symptomatik variiert zwischen leichten Palpitationen und Brustschmerzen bis hin zu lebensbedrohlichen Arrhythmien und Kardiomyopathie. Während die meisten Patienten sich wieder erholen, kann es bei einigen auch zu bleibenden Schädigungen kommen, wie chronische Myokarditis oder Kardiomyopathie (Melnick, 1996; Stalkup und Chilukuri, 2002). Es ist zu vermuten, dass in der Mehrzahl der Fälle sich eine akute Myokarditis lediglich in Form eines grippalen Infektes mit unspezifischen Symptomen äußert (Leslie et al. 1989).

Im Rahmen von Coxsackievirusinfektionen treten nicht selten Myokarditiden auf. Man geht davon aus, dass es in 5 Prozent aller klinisch manifesten Infektionen zu myokardialen Affektionen kommt. Zwar dürften die meisten dieser Erkrankungen folgenlos ausheilen, jedoch kann es in Einzelfällen auch zu chronischen Verlaufsformen mit dilatativer Kardiomyopathie kommen. Männer scheinen häufiger betroffen zu sein als Frauen. Man geht davon aus, dass die Serotypen CVB-1 bis CVB-5 potentielle Auslöser sind (Doerr, 1973; Grist, 1969).

In Europa und den USA sind virale Erkrankungen die Hauptursache der Myokarditis, wobei in der überwiegenden Zahl der Fälle Picornaviren die Auslöser sind (Woodruff, 1980). Laut Stalkup und Chirikuri (2002) sind 67 Prozent der viralen Ursachen von kardiovaskulären Symptomen durch Enteroviren bedingt. Coxsackie-B-Viren der Gruppe 1 bis 5 dürften dabei mehrheitlich verantwortlich zu sein, vermutlich handelt es sich bei

der CVB-Myokarditis sogar um die Hauptursache der Myokarditis überhaupt (Lerner et al. 1975).

Zu den ersten Wissenschaftlern, die Coxsackie-Viren im Myokard nachweisen konnten gehörten Kanadolf et al. (Kandolf et al. 1985a; Kandolf und Hofschneider, 1989). Die Autorengruppe entwickelte und verbesserte auch die entsprechenden Nachweisverfahren, wie zum Beispiel die Nukleinsäuren-Hybridisierung (Kandolf et al. 1985b; Kandolf et al. 1987).

In einer Untersuchung an Biopsiegewebe von 50 Patienten mit gesicherter Myokarditis oder dilatativer Kardiomyopathie konnten bei 28 Patienten (56%) CVB nachgewiesen werden (Archard et al. 1987). In einer anderen Untersuchung an Biopsiematerial von Myokarditispatienten waren 5 von 6 Proben CVB-positiv. Man vermutete den Serotyp CVB-3 als maßgeblich verantwortlich (Nicholson et al. 1995).

Die Ätiologie und Pathogenese der viralen Myokarditis sind bis heute noch nicht vollkommen geklärt (Maisch et al. 2002). Erst die Einführung moderner molekularbiologischer, histologischer und immunhistologischer Verfahren ermöglichte es, virales Genom im Myokard nachzuweisen und die myokardiale Entzündungsreaktion zu beurteilen (Pankuweit et al. 2000; Maisch et al. 2003). Erstmals gelang es Bowles et al. (1986) enterovirales Genom bzw. Coxsackie-B-Virus-spezifische RNA im Myokard nachzuweisen. Enterovirales Genom wurde im Rahmen endomyokardialer Biopsien bei 3 bis 40 Prozent der Patienten mit entzündlicher Herzerkrankung gefunden (Pankuweit et al. 2000).

Man vermutet, dass Virusinfektionen eine der pathogenetischen Hauptursachen der entzündlichen dilatativen Myokarditis sind (Pankuweit et al. 2002).

Die mikrobielle Infektion ruft zunächst eine antimikrobielle Immunantwort hervor, die sich humoraler und zellulärer Effektorregulatoremechanismen bedient. Sowohl die lytische Virusaktivität allein als auch die antivirale Immunantwort können Entzündungen am Myokard durch Myozytolysen hervorrufen (Woodruff, 1980; Maisch et al. 1993; Martin et al. 1994). Mit der Infektion kann es zur autoimmunen Reaktion gegen das eigene Herz kommen (Maisch, 1986; Kühl et al. 1992; Pohlner et al. 1997). Antigenes,

meist molekulares Mimikry dürfte dabei ein wichtiges pathologisches Prinzip sein, das zur antikardialen Autoreaktivität führt (Maisch, 1986; Hengstenberg et al. 1991; Maisch et al. 1993; Pohlner et al. 1997; Maisch et al. 2002). Diese wird von T-Suppressor- und T-Helfer-Zellen gesteuert und von humoralen (antikörpervermittelten) und zellulären T-Lymphozyten- und Makrophageneffektormechanismen geprägt (Maisch, 1998).

In einigen Studien konnte bei Myokarditispatienten eine antigenspezifische Immunantwort gegen kardiale Epitope gezeigt werden. So konnte bei 54 Patienten mit histologisch gesicherter Myokarditis mit einer Häufigkeit von 73 Prozent Autoantikörper gegen kardiales Gewebe beobachtet werden (Pankuweit et al. 1997).

#### 1.6.1.3 Aseptische Meningitis

Über 80 Prozent aller Fälle von aseptischer Meningitis sind vermutlich durch Enteroviren verursacht (Rotbart, 1995). Dabei sind sehr oft CBV für diese Komplikation verantwortlich. Eine Studie bei Kleinkindern mit aseptischer Meningitis ergab, dass in ca. der Hälfte der Fälle, in welchen ein positiver Virusnachweis geführt werden konnte, Coxsackie-B-Viren vom Typ CBV-2, CBV-4 und CBV-5 verantwortlich waren (Berlin et al. 1993).

Obwohl die Prognose überwiegend günstig ist, kommen auch Fälle mit lebensbedrohlicher bzw. tödlicher Bulbärparalyse vor. Schwerwiegendere Fälle sind oft vergesellschaftet mit einer Enzephalitis; bisweilen kann es zu polioähnlichen Krankheitsbildern mit Paresen kommen (Grist, 1978).

## 1.7 Diagnostik

Aufgrund der Verschiedenartigkeit der klinischen Manifestationen von Coxsackie- bzw. Enterovirusinfektionen ist die Diagnose in der Regel nicht anhand des Krankheitsbildes alleine zu stellen. Auch wenn eine spezifische Therapie heute noch nicht möglich ist, ist es dennoch in bestimmten Fällen wichtig, zwischen einer Viruserkrankung und einer anderen behandelbaren ähnlichen Erkrankung zu unterscheiden, wie zum Beispiel bei neurologischen Affektionen oder aber auch bei der akuten Myokarditis (Chonmaitree et al. 1989). Unkenntnis führt zu unnötigen Behandlungen, Untersuchungen und diagnostischen Tests (Rotbart, 1995). Es kommt dabei oftmals primär nicht darauf an, den Serotypus zu kennen (Stalkup und Chilukuri, 2002).

Bei unkomplizierten Infektionen dauert die Identifikation des Serotypen ca. ein bis zwei Wochen und spielt somit keine Rolle bei der Behandlung des Patienten (Muir et al. 1998).

Traditionell wird der Nachweis von Coxsackie- bzw. Enteroviren meist mittels Isolation in der Zellkultur durchgeführt, wobei die Identifikation der Serotypen durch Neutralisation der Infektiosität mittels serotypspezifischer Antikörper erfolgt (Muir et al. 1998). Da die Serotypenidentifikation mittels monospezifischer Neutralisationsseren sehr aufwändig ist, wird in der Regel eine Testung mit standardisierten Antiserumpools durchgeführt. Die Virusidentifikation erfolgt dann anhand der beobachteten Neutralisationsreaktionen in den einzelnen Pools bzw. der Kenntnis der in diesen Pools enthaltenen spezifischen Antiseren (Lim und Benyesh-Melnick, 1960). Diese Art der Diagnostik wurde bis vor kurzem als Goldstandard der Diagnostik bezeichnet (Stalkup und Chilukuri, 2002).

Coxsackie- bzw. Enteroviren können aus Materialien wie Blut, Liquor, Urin Stuhl sowie aus den meisten Gewebeproben kultiviert werden (Pallansch und Roos, 2001; Sawyer 2002).

Während die Viruskultur mit anschließender Typisierung ein relativ zeitaufwändiges Verfahren ist, können mittels Immunfluoreszenz-Verfahren bestimmte Virenantigene auch schon nach kürzerer Zeit nachgewiesen werden. Dabei lassen sich, wiederum mit kombinierten Antiseren-Pools, typenspezifische Antigene binnen weniger Stunden identifizieren, die dann Hinweise auf den Virustypen zulassen. Daneben stehen noch verschiedene ELISA-Schnelltests zur Nachweis von Coxsackie-Antigenen zur Verfügung (Lim und Beneysh-Melnick, 1960; Yolken und Torsch, 1981). Für alle sechs CVB-Serotypen ist seit 1980 ein hochempfindlicher ELISA-Test verfügbar (Yolken und Torsch, 1980).

Ein anderes Verfahren zur Typisierung von Enteroviren stellt die Nukleinsäurehybridisierung dar. Hierbei wird der Virusnachweis über das Virusgenom bzw. über bestimmte Nukleotidsequenzen geführt. Mit diesem Verfahren können bereits alle CVB-Typen differenziert werden. Grundlage des Verfahrens ist zunächst die synthetische Herstellung von Oligonukleotidketten, auf der Basis der VP1-Nukleotid-Sequenzen von CVB. Die markierten Oligonukleotidketten hybridisieren in einer typenspezifischen Weise, wenn sie mit dem Zellextrakt von infizierten Zellen in Kontakt kommen. Das Verfahren dauert bei Anwendung von radioaktiv markierter Nukleotidsequenz weniger als zwei Tage (Alksnis et al. 1989; Tracy und Latham, 1986).

Ein weiteres Verfahren zur Identifikation von Viren anhand der Nukleinsäuren ist die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR), wobei die Nachweismempfindlichkeit weit über jene der o.g. Nukleinsäurehybridisierung hinausgeht, da bei diesem Verfahren detektierte Genomabschnitte millionenfach vervielfältigt werden (Rotbart, 1990). Die PCR gilt heute als schnelles, spezifisches und sensitives Instrument bei der Diagnostik von Enterovirusinfektionen (Abzug, 2004).

Eine indirekte Methode zum Nachweis von Virusinfektionen stellt der Nachweis von spezifischen Antikörpern (AK) dar. Hierbei können bestimmte Antikörper noch Jahre nach der abgelaufenen Infektion nachgewiesen werden. Um etwas über den Verlauf bzw. die Aktualität der Infektion aussagen zu können, sind in der Regel mindestens zwei Untersuchungen in ausreichend großen zeitlichen Abständen erforderlich. Das am

häufigsten angewandte Testverfahren ist der sog. Neutralisationstest (NT). Hierbei werden die Seren in Verdünnungsreihen auf das Vorhandensein von neutralisierenden AK untersucht. Als Indiz für eine frische Infektion gelten mindestens vierfache Titeranstiege in zwei, zeitversetzt gewonnen, Proben. Hohe Titer alleine sind in der Regel nicht beweisend bzw. können auch bei zurückliegenden Infektionen vorkommen (Doerr, 1973; Sawyer, 2002; Stalkup und Chilikuri, 2002).

Nicht eindeutig zu interpretieren sind die Ergebnisse des NT dann, wenn bereits frühzeitig im Rahmen einer Infektion hohe Titer auftreten, die dann im weiteren Verlauf nicht mehr weiter ansteigen (Lennette et al. 1961).

Als Alternative zum Neutralisationstest dient die Bestimmung von IgM-Antikörpern, insbesondere dann, wenn nur eine einzelne Serumprobe und kein anderes geeignetes Material vorliegt (Grandien und Olding-Stenkvis, 1984; del Rosario Zuniga et al. 1993; Zhang et al. 2001).

Die Bestimmung der IgM-Antikörper wird üblicherweise mittels ELISA durchgeführt, wobei es hierbei sowohl zu falsch negativen als auch zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann, was zum Beispiel durch Interferenzen mit IgG oder aber auch mit Rheumafaktoren (RF) bzw. IgM-RF bedingt ist (Champsaur et al. 1988). Bei der Interpretation des Befundes ist zu beachten, dass IgM-Antikörper, nicht wie ursprünglich angenommen, nur während der akuten Phase der Infektion nachweisbar sind, sondern möglicherweise auch monatelang persistieren (Eggers und Mertens, 1986).

In einer groß angelegten Studie zum Vergleich verschiedener Labormethoden erwiesen sich Virusnachweis durch Zellkultur und PCR als überlegen gegenüber AK-Nachweisverfahren wie NT und IgM-Serologie. Als empfohlene Methode für die Diagnostik von Enterovirusinfektionen wird die Virus-Isolierung bzw. Kultivierung aus Stuhlproben empfohlen. In Fällen von aseptischer Meningitis können Virusisolierung aus der Rückenmarksflüssigkeit und PCR wertvolle Mittel für den direkten Virusnachweis sein (Buxbaum et al. 2001).

## 1.8 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Enterovirus- bzw. CVB-Infektionen können eine Vielzahl klinischer Symptome hervorrufen, wobei in der Regel allenfalls eine Verdachtsdiagnose möglich ist. Um unnötige Behandlungen und Untersuchungen vermeiden zu können, kann es notwendig sein, eine genaue Diagnose stellen zu müssen. Dies gilt insbesondere für schwerwiegende Krankheitsverläufe oder für Erkrankungen bei Neugeborenen, bei welchen CBV-Infektionen nicht selten einen fulminanten Verlauf zeigen.

Für die Diagnostik von CBV-Infektionen stehen eine Reihe von labortechnischen Untersuchungsmethoden zur Verfügung, die es ermöglichen einen Verdacht zu erhärten oder aber eine Erkrankung auszuschließen. Hinsichtlich der Aussagekraft bzw. der Sensitivität und Spezifität unterscheiden sich alle Verfahren. Die Wahl der Entscheidung für das geeignete Diagnostikverfahren hängt ab von Art und Qualität des Probenmaterials sowie vom Zeitpunkt der Probenentnahme.

Grundsätzlich sind zwei Verfahren zur Diagnostik von CVB-Infektionen möglich. 1.) Der Nachweis von Viren oder von Virengenom selbst, durch Virenkultur und anschließende Spezifizierung bzw. durch Verfahren wie Nukleinsäurehybridisierung. 2.) Der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern mittels des Neutralisationstests (NT) oder von IgG-, IgA- und IgM-Antikörpern, zum Beispiel mittels ELISA-Testverfahren.

Für den direkten Nachweis von Viren oder Virengenom ist geeignetes Untersuchungsmaterial erforderlich. In der Regel handelt es sich um Stuhl-, Liquor- oder Speichelproben oder aber um Material aus infiziertem Gewebe. Der indirekte Nachweis der Infektion gelingt durch den Antikörpernachweis aus dem Serum. Beim direkten Virennachweis ist die Qualität des Untersuchungsmaterial von entscheidender Bedeutung. Beim Nachweis der Antikörper kommt es auf die richtigen Zeitpunkte der Blutentnahme an.



Im Rahmen dieser Untersuchung kamen zwei indirekte Nachweisverfahren zum Einsatz, nämlich der Neutralisationstest und der ELISA-Test.

Schwierigkeiten bei der Befundinterpretation bzw. beim Nachweis einer akuten Erkrankung sind bei beiden Testverfahren gegeben. Beim NT sind nicht immer die zur Diagnosesicherheit erforderlichen Titterschwankungen zu erfassen; die IgM-Bestimmung beim ELISA-Test wird durch Faktoren wie Kreuzreaktion sowie durch Interferenzen mit Rheumafaktoren und IgG-AK beeinflusst. Zu berücksichtigen ist ferner, dass IgM-AK auch in Abwesenheit einer akuten Erkrankung nachweisbar sein können.

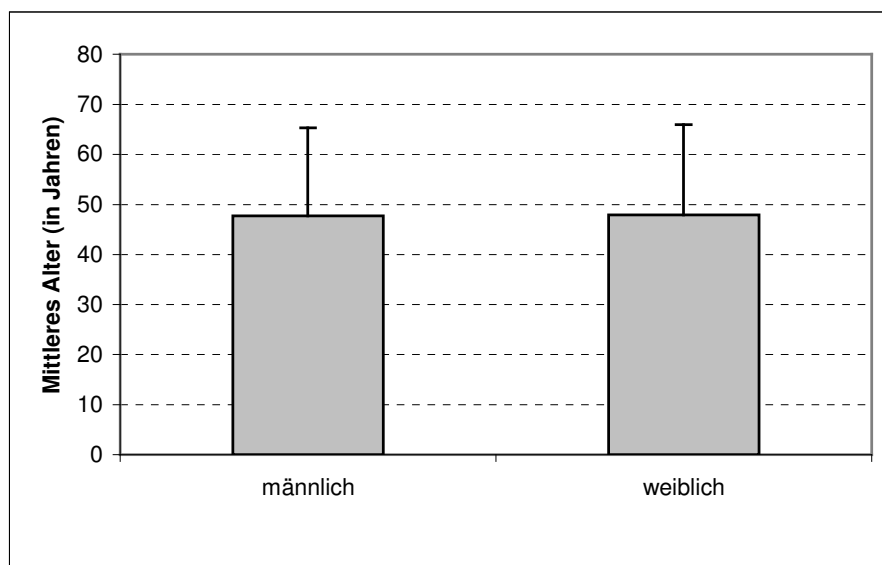
Ziel unserer Untersuchung war es, die beiden Verfahren miteinander zu vergleichen. Es sollte festgestellt werden, welches der beiden Testverfahren möglicherweise besser für die Diagnostik geeignet sein könnte und ob beide Testverfahren vergleichbare Resultate erbringen. Hintergrund der Überlegungen war der Umstand, dass der Neutralisationstest einen hohen Aufwand an Zeit und Personal erfordert, während der ELISA-Test automatisierbar ist.

## 2 Methodik

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Im Rahmen dieser Studie wurden die Seren von 523 Patienten untersucht, bei denen in den Jahren 1996 und 1997 im virologischen Institut des Zentrums für Hygiene der Universität Marburg, die Verdachtsdiagnose einer Myokarditis gestellt worden war. Die Seren stammten von 189 weiblichen und 334 männlichen Patienten. Das mittlere Alter dieser Patienten betrug ca. 48 Jahre und war bei beiden Geschlechtern etwa gleich hoch (Abb. 6). Bei den Seren der weiblichen Patienten lag die Altersspanne zwischen zwei und 82 Jahren, bei den männlichen zwischen einem und 98 Jahren (Tab. 3).

**Abb. 6:** Mittleres Alter der Patienten.



**Tab. 3:** Altersverteilung der Patienten (in Jahren).

	Anzahl	mittleres Alter		Spanne	
		MW	SD	Min.	Max.
männlich	334	47,7	17,7	1	98
weiblich	189	47,9	18,1	2	82
gesamt	523	47,7	17,8	1	98

## 2.2 ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der Coxsackievirus-spezifischen IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern kam das kommerzielle Testverfahren "*SERION* ELISA classic" der Firma "Virion ■ Serion" zum Einsatz. Die verwendeten Testkits beinhalteten folgende Materialien:

- Mikrotteststreifen bzw. Mikrotiterplatten (verpackt mit Trockenmittel)
- Kontroll- und Standardseren (Positiv- und Negativkontrolle)
- Anti-Human-IgG-, IgM- und IgA-Konjugate (mit Verdünnungspuffer)
- Waschlösung (Konzentrat zur Verdünnung mit aqua dest.)
- Verdünnungspuffer für Seren
- Substratpuffer und Substrat
- Stopp-Lösung

Bei dieser indirekten ELISA-Technik sind Mikrotteststreifen mit dem Antigenen von Coxsackie-Viren bzw. mit Kontrollantigenen beschichtet. Die in der Patientenprobe vorliegenden spezifischen Antikörper (AK) binden an diese festphasenfixierten Antigene. Diese Antigene sind gruppenspezifisch und dienen zum Nachweis heterotypischer (nicht Serotyp-spezifischer) AK. Abhängig vom Grad der heterotypischen Immunantwort des Patienten können bei diesem Testverfahren Kreuzreaktionen mit anderen Vertretern der Enterovirus-Gruppe auftreten. Die Antigenpräparation enthält gereinigte Partikel der Coxsackie-Virus-Typen B1 und B5 (beinhaltet genospezifische Epitope von allen Coxsackie-Virus-Subtypen).

Um die serologische Reaktion sichtbar zu machen, werden bei diesem Verfahren mit alkalischer Phosphatase (AP) markierte Nachweis-AK eingesetzt, die im positiven Fall an die Antigen-gebundenen Immunglobuline des Teststreifens andocken. Nach anschließender Zugabe von para-Nitrophenylphosphat erfolgt eine enzymatische Reaktion die zu einer Gelbfärbung führt. Die Intensität dieser Gelbfärbung ist dem Gehalt spezifi-

scher AK proportional. Durch photometrische Messung erfolgt die quantitative Bestimmung der Immunglobuline in Units pro ml (U/ml).

### **2.2.1 Durchführung der Tests**

Bei der Durchführung der Tests wurden die Arbeitsvorschriften des Testverfahrens streng eingehalten (SERION ELISA classic, Coxsackievirus IgA, IgA, IgM quant. / Arbeitsanleitung V 07/97 ab).

Für die Bestimmung der IgM- und IgA-AK wurde das Serum im Verhältnis 1 + 100 mit Pufferlösung verdünnt. Je 10 µl Patientenserum wurden mit 1000 µl Verdünnungspuffer gemischt.

Für die Bestimmung der IgG-AK wurde das Serum im Verhältnis 1 + 500 mit Pufferlösung verdünnt. Hierbei wurden zunächst je 10 µl Patientenserum mit 1000 µl Verdünnungspuffer gemischt. Von diesem verdünnten Serum (1 + 100) wurden anschließend 50 µl entnommen und nochmals mit 200 µl Pufferlösung verdünnt (=1 + 4).

Je 100 µl der verdünnten Patientenseren wurden in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Danach erfolgte eine Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C für die Dauer von 60 Minuten.

Nach der Inkubation erfolgte ein viermaliger Waschvorgang. Nach Trocknung bzw. nach dem Ausklopfen der Testplatte auf Papiertüchern erfolgte die Zugabe des Konjugats (IgG-, IgM- bzw. IgA-Konjugat. Das Konjugat wurde zu diesem Zweck zunächst im Verhältnis 1 + 100 verdünnt und danach in die entsprechenden Kavitäten pipettiert (100 µl). Anschließend erfolgte nochmals eine Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C für die Dauer von 30 Minuten.

Nach dieser Inkubation erfolgte wiederum ein viermaliger Waschvorgang, um dann die Kavitäten der Testplatte mit je 100 µl Substratlösung aufzufüllen. Anschließend erfolgte

wieder eine Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C für die Dauer von 30 Minuten.

Nach diesem letzten Inkubationsvorgang wurde in alle Kavitäten der Mikrotiterplatte je 100 µl Stopp-Lösung pipettiert. Danach wurde innerhalb von 60 Minuten die Extinktion gegen den Substratleerwert gemessen und so die AK-Menge abgeleitet.

Bei jeder Testreihe wurden Kontrollseren (Positiv- und Negativkontrolle) mitgeführt.

Die Interpretation der Testergebnisse erfolge gemäß folgender Tabelle (Tab. 4).

**Tab. 4:** Interpretation der ELISA-Testergebnisse.

Testergebnis	IgG (U/ml)	IgM (U/ml)	IgA (U/ml)
positiv	>100	>50	>50
grenzwertig	80-100	30-50	30-50
negativ	<80	<30	<30

## 2.3 Neutralisationstest (NT)

Die Testdurchführung erfolgte in Anlehnung an die Arbeitsanweisung "AM-VI-118/A" des Institutes für Virologie der Universität Marburg. Alle Arbeitsvorschriften wurden streng eingehalten.

### 2.3.1 Testprinzip

Definierte Konzentrationen von vermehrungsfähigen Coxsackieviren (CoxB1 bis CoxB5) werden mit Serum-/Plasmaverdünnungen inkubiert. Anschließend erfolgt die

Inokulation empfänglicher Zellkulturen mit den Inkubationsansätzen. Im positiven Fall wird während des Inkubationsschrittes die Infektiosität des Virustypen neutralisiert, so dass die Infektion der Zellen und der virusbedingte cytopathische Effekt (CPE) ausbleibt. Der reziproke Wert der höchsten Probenverdünnung, durch die bei den einzelnen Virustypen der virale CPE zu 50 Prozent gehemmt wird, ist als Virustyp-spezifischer Neutralisationstiter definiert.

Messbereich	4-256 (Serumverdünnung 1:4 bis 1:256)
Einheiten	Titer (reziproker Wert der wirksamen Serumverdünnung)
Untersuchungsmaterial	Serum / Plasma
Mindest-Probenmenge	0,100 ml
Mindest-Probeneinsatz	0,025 ml
Präanalytik	Inaktivierung der Seren bei 56 °C im Wasserbad für 30 Min.
Probenaufbewahrung	Im Kühlschrank bei 2-8 °C maximal 7 Tage

Folgende Geräte und Reagenzien kamen zum Einsatz:

Analysegerät	Begaster Brutschrank (Fa. Heraeus) 37 °C Zellkulturmikroskop (Fa. Leitz) Sterilbank (Fa. Heraeus)
Reagenzien (mit Bezugsquelle)	<u>Fa. GIBCO BRL</u> Trypsin EDTA (Cat.No. 25300-054) <u>Fa. BIOCHROM KG</u> Instamed MEM-EARLE wL-Glutamine, w/o NaHCO <sub>3</sub> (Cat.No. T 437-10) <u>Fa. UNCLON</u> TM Surface, sterile Gewebekulturgefäße <u>Fa. NUNC</u> Brand Products 96 well-Zellkulturplatten  PBS-Puffer (Selbsterstellung)

### 2.3.2 Testdurchführung

Da beim NT Zellkulturen zum Einsatz kamen erfolgte die Abarbeitung der einzelnen Schritte unter sterilen Bedingungen (Sterilbank).

#### Serum-/Plasma-Hitze-Inaktivierung und -Verdünnung:

- 300 µl Serum wurden im Wasserbad bei 56°C für die Dauer von 30 Minuten inaktiviert.
- Sterile Zellkulturplatten wurden mit Probennummer und Antigentyp beschriftet und mit 25 µl PBS-Puffer befüllt. Dabei wurden separate Platten für jeden Virustyp sowie die Serumkontrolle (Ausschluss von Serumtoxizität) vorgesehen.
- Der 1. Cup wurde mit 25 µl inaktiviertem Serum befüllt. Danach erfolgte die Verdünnung von Cup 1 bis Cup 8 (Verdünnung: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256). Dieser Schritt wurde für jeden Virustyp sowie die Serumkontrolle im Doppelansatz durchgeführt.

#### Herstellung der Virus-Testverdünnung:

- CoxB1 (Definierter Virus-Pool auf AN2 vom 19.07.1974): 1. Herstellung einer Verdünnung  $10^{-1}$  (200 µl Virus-Pool CoxB1 + 1800 µl PBS). 2. Testverdünnung: 1000 µl der  $10^{-1}$ -Verdünnung + 24ml PBS.
- CoxB2 (Definierter Virus-Pool auf AN2 vom 19.07.1974): 1. Herstellung einer Verdünnung  $10^{-1}$  (200 µl Virus-Pool CoxB2 + 1800 µl PBS). 2. Testverdünnung: 1000 µl der  $10^{-1}$ -Verdünnung + 24ml PBS.
- CoxB3 (Definierter Virus-Pool auf AN2 vom 19.07.1974): 1. Herstellung einer Verdünnung  $10^{-1}$  (200 µl Virus-Pool CoxB3 + 1800 µl PBS). 2. Testverdünnung: 1000 µl der  $10^{-1}$ -Verdünnung + 24ml PBS.
- CoxB4 (Definierter Virus-Pool auf AN2 vom 19.07.1974): 1. Herstellung einer Verdünnung  $10^{-1}$  (200 µl Virus-Pool CoxB4 + 1800 µl PBS). 2. Testverdünnung: 1000 µl der  $10^{-1}$ -Verdünnung + 24ml PBS.



- CoxB5 (Definierter Virus-Pool auf AN2 vom 19.07.1974): 1. Herstellung einer Verdünnung  $10^{-1}$  (200  $\mu$ l Virus-Pool CoxB5 + 1800  $\mu$ l PBS). 2. Testverdünnung: 1000  $\mu$ l der  $10^{-1}$ -Verdünnung + 24ml PBS.

Inkubation der Serumverdünnungen mit den Virus-Testverdünnungen (Neutralisations-schritt):

25  $\mu$ l der Virus-Testverdünnungen CoxB1 bis CoxB5 wurden in die vorbereiteten Cups 1-8 der Serum-Verdünnungsreihen gegeben. Die Serumkontrollplatte wurde zum Volumenausgleich mit 25  $\mu$ l PBS/Cup beschickt. Danach wurden die Mikrotiterplatten abgedeckt für die Dauer einer Stunde bei 37°C inkubiert.

Antigen- und Zellkulturkontrolle:

Die Antigenkontrolle wurde zur Überprüfung der Infektiosität der definierten Virus-Pools, die Zellkulturkontrolle zur Überprüfung des Wachstumsverhaltens der nicht infizierten Kulturzellen durchgeführt.

Für die Durchführung der Antigenkontrollen wurde, ausgehend von den Virus-Testverdünnungen, die in 25  $\mu$ l jeweils 100 TC ID<sub>50</sub> enthielten, nach geeigneter Vorverdünnung, in entsprechende Cups einer vormarkierten Mikrotiterplatte, eine definierte Menge infektiöser Einheiten pipettiert:

- Cup 1: 200 TC ID<sub>50</sub> = 50  $\mu$ l Virus-Testverdünnung
- Cup 2: 100 TC ID<sub>50</sub> = 25  $\mu$ l Virus-Testverdünnung
- Cup 3: 50 TC ID<sub>50</sub> = 1:2 Verdünnung von Cup 2 (in 50  $\mu$ l)
- Cup 4: 25 TC ID<sub>50</sub> = 1:2 Verdünnung von Cup 3 (in 50  $\mu$ l)

Die Verdünnungsreihen wurden für jeden Virustyp vierfach angesetzt.

Für die Durchführung der Zellkultur-Kontrolle wurden 4 x 4 Cups mit 50  $\mu$ l PBS beschickt.

Diese vorbereiteten Antigen- und Zellkulturkontrollplatten wurden ebenfalls für die Dauer einer Stunde bei 37°C inkubiert.

#### Herstellung der Zellkultursuspension:

- Zweimaliges Waschen einer dicht bewachsenen Flasche einer Hela-Zellkultur mit PBS.
- Ablösung der Zellen mittels Trypsin-EDTA und Resuspension in einer definierten Menge Kulturmedium.
- Nach Zellzählung wurde die Zellsuspension durch Zugabe von Kulturmedium bei Bedarf so eingestellt, dass in 50 µl Zellsuspension etwa  $10^4$  Zellen enthalten waren.

#### Inkubation der Testansätze mit Kulturzellen:

Alle Testansätze der Patientenproben und der Kontrollen (Antigen-, Zellkulturkontrolle) wurden mit je 50 µl der Kulturzellen-Suspension beschickt und anschließend bei 37° inkubiert.

#### Auswertung:

Die Auswertung erfolgte mittels Zellkulturmikroskop (48-fache Vergrößerung) nach ein bis zwei Tagen Inkubation, wenn sich in den Cups der Zellkulturkontrolle ein geschlossener Rasen gebildet hatte und die Antigenkontrolle einen deutlichen virusbedingten cytoplasmatischen Effekt (CPE) zeigte. Jene Serum-Verdünnungsstufe, die 50 Prozent der Kulturzellen vor dem virusbedingten CPE schützte, wurde für die Bewertung des Neutralisationseffektes zu Grunde gelegt.

## 2.4 Statistik

Alle Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Version 11 durchgeführt.

In der Regel handelt es sich bei den folgenden Darstellungen um rein deskriptive Analysen. Für die untersuchten Merkmale wurden die absoluten Zahlen sowie der relative Anteil in Prozent ermittelt.

Für die Gruppenvergleiche (männlich/weiblich) wurde der T-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Das Konfidenzintervall wurde mit 95 Prozent, das Signifikanzniveau mit 0,05 (2-seitig) festgelegt. Die Gleichheit der Varianzen wurde mit dem Levene-Test überprüft. Dabei wurde eine Homogenität der Varianzen dann angenommen, wenn die Signifikanz dieses Tests größer als 0,25 war. Bei Ergebnissen kleiner 0,05 wurde von inhomogenen Varianzen ausgegangen und die entsprechende Signifikanz des T-Tests gewählt. Für den Bereich dazwischen (0,05 bis 0,25) wurde jeweils die zugehörige schwächere Signifikanz des T-Tests gewählt, um die Sicherheit der Aussage zu erhöhen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse ELISA

##### 3.1.1 Gesamtergebnis

Insgesamt wurden 523 Patienten untersucht bzw. 523 Serumproben analysiert. Bei 517 dieser 523 Proben wurden ELISA-Testungen durchgeführt und IgA-, IgG- oder IgM-Antikörper bestimmt. Der Anteil der seropositiven Patienten lag bei den Frauen mit 40,3 Prozent etwas höher als bei den Männern mit 30,2 Prozent. Geschlechtsunabhängig lag der Anteil der seropositiven Patienten bei 33,8 Prozent. Als seropositiv wurden alle Patienten betrachtet, die zumindest hinsichtlich eines der drei Immunglobuline (IgA, IgG oder IgM) einen positiven Befund aufwiesen. Bei 10,4 Prozent der Patienten war der Befund grenzwertig; bei 55,7 Prozent war der Befund negativ, d.h. keiner der drei Immunglobuline wies ein positives Resultat auf (Tab. 5).

**Tab. 5:** Gesamtergebnis ELISA (IgA, IgG und IgM).

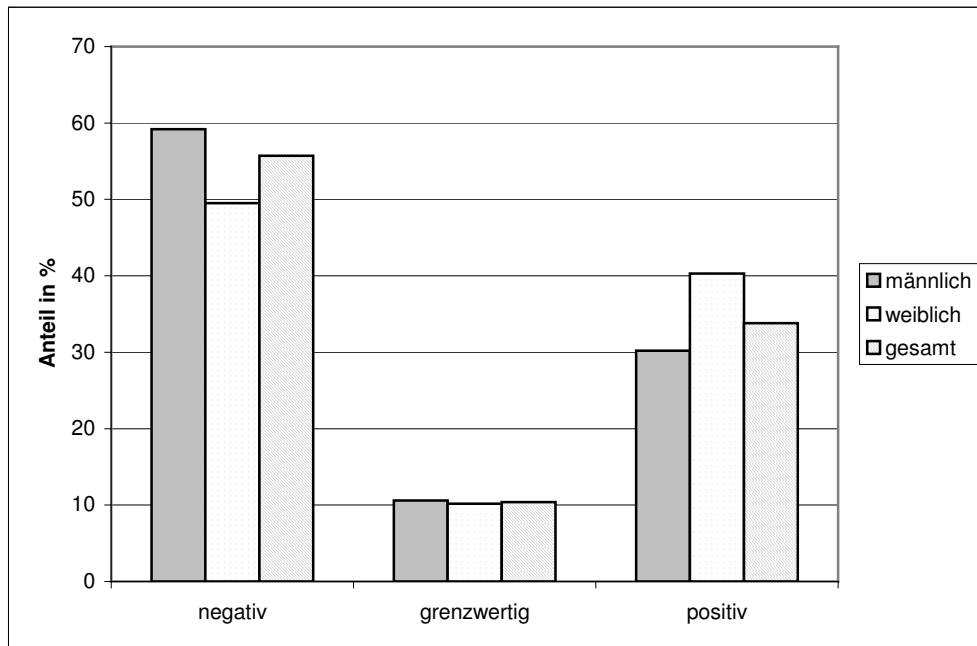
	negativ		grenzwertig		positiv		gesamt	
	N	%	N	%	N	%	N	%
männlich	196	59,2	35	10,6	100	30,2	331	100
weiblich	92	49,5	19	10,2	75	40,3	186	100
gesamt	288	55,7	54	10,4	175	33,8	517	100

Positiv : Mindestens ein Parameter (IgA, IgG oder IgM) positiv.

Grenzwertig: Mindestens ein Parameter (IgA, IgG, IgM) grenzwertig und kein Parameter positiv.

Negativ: Alle Parameter (IgA, IgG, IgM) negativ.

Die nachfolgende Grafik veranschaulicht noch einmal, dass der Anteil der Patienten mit negativem Befund höher war, als der Anteil der seropositiven Patienten. Es ist ferner erkennbar, dass sich keine wesentlichen geschlechterspezifischen Unterschiede ergeben haben (Abb. 7).

**Abb. 7:** Gesamtergebnis ELISA (IgA, IgG und IgM) in Abhängigkeit vom Geschlecht.

Positiv : Mindestens ein Parameter (IgA, IgG oder IgM) positiv.

Grenzwertig: Mindestens ein Parameter (IgA, IgG, IgM) grenzwertig und kein Parameter positiv.

Negativ: Alle Parameter (IgA, IgG, IgM) negativ.

### 3.1.2 Immunglobulinspezifische Ergebnisse

#### 3.1.2.1 ELISA-IgA

Von den 523 untersuchten Patienten wurden bei 513 Patienten IgA-Antikörper-Bestimmungen mittels ELISA durchgeführt. Ein positives Ergebnis fand sich bei 27 Patienten (5,3%). Bei 13 Patienten (2,5%) war der Befund grenzwertig; 473 Proben (92,2%) wiesen ein negatives Ergebnis auf (Tab. 6).

**Tab. 6:** ELISA (IgA).

	negativ		grenzwertig		positiv		gesamt	
	N	%	N	%	N	%	N	%
männlich	305	92,7	8	2,4	16	4,9	329	100
weiblich	168	91,3	5	2,7	11	6,0	184	100
gesamt	473	92,2	13	2,5	27	5,3	513	100

### 3.1.2.2 ELISA-IgG

Von den 523 untersuchten Patienten wurden bei 512 Patienten IgG-Antikörper-Bestimmungen mittels ELISA durchgeführt. Ein positives Ergebnis fand sich bei 146 Patienten (28,5%). Bei 42 Patienten (8,2%) war der Befund grenzwertig; 324 Proben (63,3%) wiesen ein negatives Ergebnis auf (Tab. 7).

**Tab. 7:** ELISA (IgG).

	negativ		grenzwertig		positiv		gesamt	
	N	%	N	%	N	%	N	%
männlich	220	67,1	28	8,5	80	24,4	328	100
weiblich	104	56,5	14	7,6	66	35,9	184	100
gesamt	324	63,3	42	8,2	146	28,5	512	100

### 3.1.2.3 ELISA-IgM

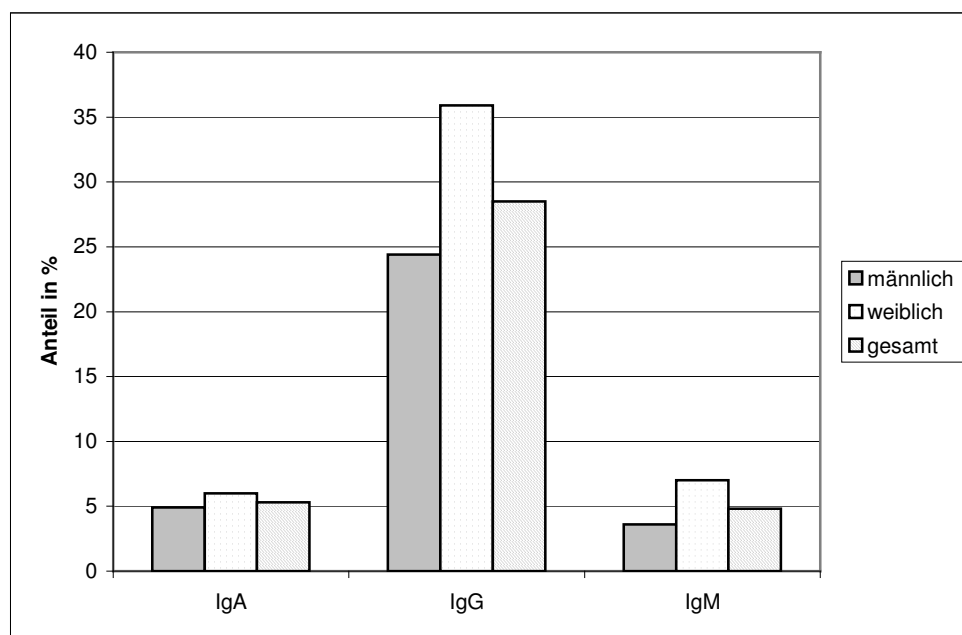
Von den 523 untersuchten Patienten wurden bei 516 Patienten IgM-Antikörper-Bestimmungen mittels ELISA durchgeführt. Ein positives Ergebnis fand sich bei 25 Patienten (4,8%). Bei 22 Patienten (4,3%) war der Befund grenzwertig; 469 Proben (90,9%) wiesen ein negatives Ergebnis auf (Tab. 8).

**Tab. 8:** ELISA (IgM).

	negativ		grenzwertig		positiv		gesamt	
	N	%	N	%	N	%	N	%
männlich	303	91,8	15	4,5	12	3,6	330	100
weiblich	166	89,2	7	3,8	13	7,0	186	100
gesamt	469	90,9	22	4,3	25	4,8	516	100

### 3.1.2.4 Zusammenfassung (IgA, IgG, IgM)

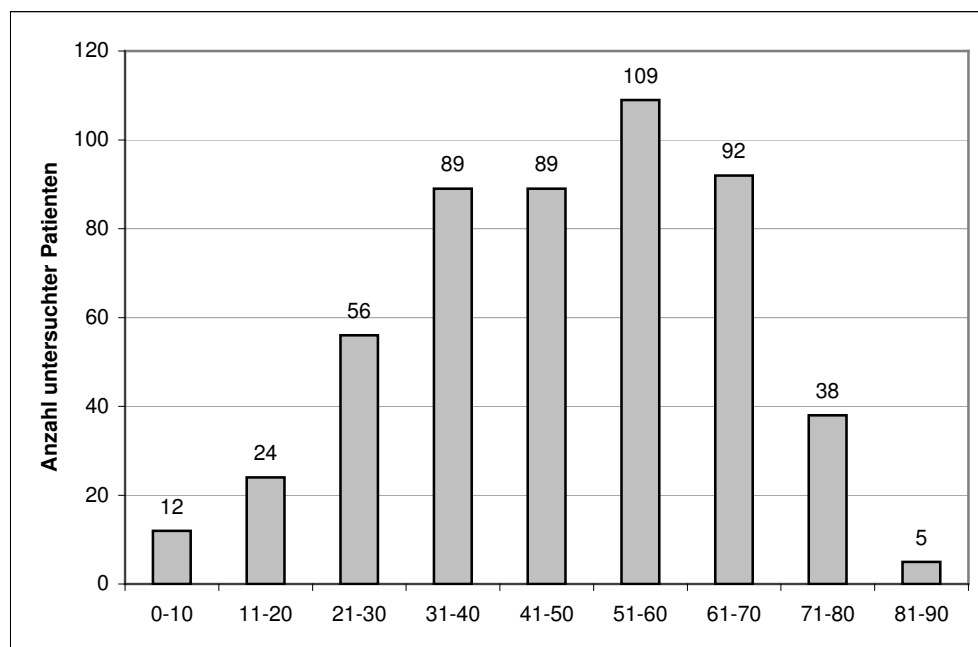
Die meisten positiven Ergebnisse fanden sich hinsichtlich des IgG. Von den 512 untersuchten Seren waren 146 (28,5%) im ELISA-IgG-Test positiv. Bei IgA und IgM lag der Anteil bei nur 5,3 bzw. 4,8 Prozent. In über 90 Prozent der Fälle fanden sich hier negative Befunde. Die relativen Häufigkeiten der drei Immunglobuline sind in der nachfolgenden Grafik nochmals veranschaulicht (Abb. 8).

**Abb. 8:** ELISA: Positive Ergebnisse (IgA, IgG und IgM).

### 3.1.3 ELISA nach Altersgruppen

Bei 514 der insgesamt 523 untersuchten Patienten wurden mittels ELISA Immunglobulin-Bestimmungen (IgA, IgG oder IgM) durchgeführt. Die meisten Patienten fanden sich in den Altersgruppen zwischen 31 und 70 Jahren, wobei sich in der Gruppe der 51-60-jährigen mit 109 Patienten (21,2%) die meisten Patienten befanden (Abb. 9).

**Abb. 9:** ELISA: Anzahl der untersuchten Patienten nach Altersgruppen.



Bei zwei Patienten keine Altersangabe. Gesamtzahl: N=514

#### 3.1.3.1 Positive Seren (IgA, IgG und IgM) und seropositive Patienten

Wie weiter oben bereits gezeigt, fanden sich mit einem Anteil von fast 30 Prozent deutlich mehr IgG-positive Patienten als IgA- oder IgM-positive Patienten, mit einem Anteil von jeweils ca. fünf Prozent. Tendenziell wiesen die Anteile der positiven Befunde für alle drei Immunglobuline einen Abwärtstrend auf; bei den jüngeren Patienten fand sich ein eher höherer Anteil seropositiver Befunde, der mit zunehmendem Alter rückläufige



Tendenz zeigte. Besonders deutlich war dieser Trend für das IgG, da hier auch die meisten Patienten positive Befunde aufwiesen. Während beispielsweise bei den Kindern und Jugendlichen (Altersgruppe 0-10 und 11-20) der Anteil IgG-positiver Seren bei etwa 40 Prozent lag, betrug dieser Anteil bei den über 70-jährigen nur noch ca. 20 Prozent und war damit nur noch etwa halb so hoch. Diese Differenz war zwar statistisch nicht signifikant, was jedoch an der geringen Anzahl der über 70-jährigen Patienten gelegen haben dürfte. Tatsächlich erbrachte ein statistischer Vergleich der Älteren ( $\geq 50$  Jahre) mit den Jüngeren ( $< 50$  Jahre) auch ein hochsignifikantes Ergebnis, welches zeigte, dass ältere Patienten seltener positive IgG-AK-Titer aufwiesen ( $p < 0,005$ ) (Tab. 9).

**Tab. 9:** ELISA: Anzahl positiver Seren (IgA, IgG, IgM) nach Altersgruppen.

Patienten- alter (Jahre)	IgA		IgG		IgM	
	N	%	N	%	N	%
0-10	0 / 12	0,0	5 / 12	41,7	2 / 12	16,7
11-20	3 / 23	13,0	9 / 23	39,1	2 / 24	8,3
21-30	3 / 55	5,5	19 / 55	34,5	4 / 56	7,1
31-40	7 / 88	8,0	31 / 88	35,2	6 / 89	6,7
41-50	5 / 88	5,7	25 / 88	28,4	4 / 88	4,5
51-60	3 / 109	2,8	23 / 108	21,3	3 / 109	2,8
61-70	6 / 92	6,5	25 / 92	27,2	2 / 92	2,2
71-80	0 / 38	0,0	8 / 38	21,1	1 / 38	2,6
81-90	0 / 5	0,0	1 / 5	20,0	1 / 5	20,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 1	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	27 / 511	5,3	146 / 510	28,6	25 / 514	4,9

Bei 2 Patienten keine Altersangabe.

Die folgende Tabelle gibt die Anzahl der seropositiven Patienten wider, also jenen Anteil der Patienten, bei welchen zumindest eines der drei Immunglobuline positiv war. Insgesamt waren 100 männliche (30,2%) und 75 weibliche Patienten (40,3%) seropositiv. Bei geschlechtunabhängiger Betrachtung fiel auch hier wieder eine gewisse Abhängigkeit von der Altersgruppe auf. Wiederum war der Anteil der seropositiven Patienten bei den Jüngeren tendenziell höher als bei den Älteren (Tab. 10).

**Tab. 10:** ELISA: Seropositive Patienten nach Altersgruppen. Vergleich männlich/weiblich.

Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
0-10	2 / 7	28,6	3 / 5	60,0	5 / 12	41,7
11-20	6 / 15	40,0	6 / 9	66,7	12 / 24	50,0
21-30	12 / 36	33,3	10 / 20	50,0	22 / 56	39,3
31-40	22 / 59	37,3	15 / 30	50,0	37 / 89	41,6
41-50	18 / 56	32,1	13 / 33	39,4	31 / 89	34,8
51-60	16 / 73	21,9	12 / 36	33,3	28 / 109	25,7
61-70	17 / 55	30,9	13 / 37	35,1	30 / 92	32,6
71-80	5 / 23	21,7	3 / 15	20,0	8 / 38	21,1
81-90	2 / 4	50,0	0 / 1	0,0	2 / 5	40,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	100 / 329	30,2*	75 / 186	40,3*	175 / 515	34,0

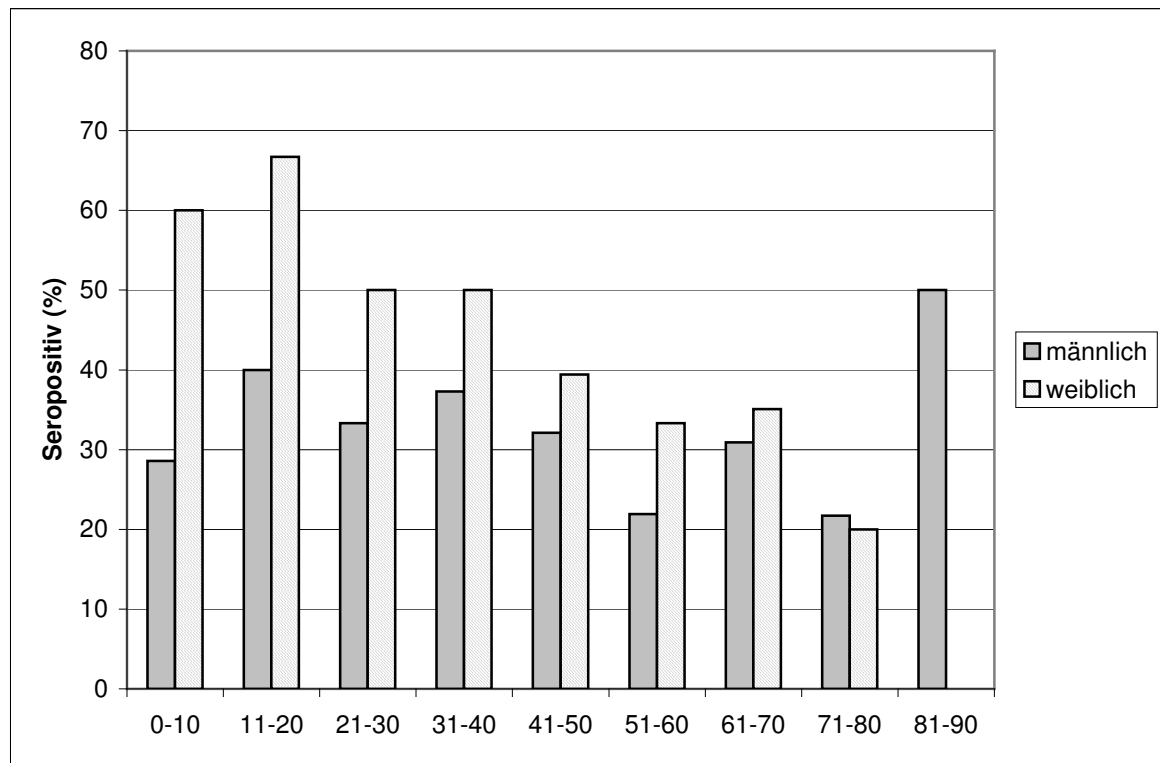
Anzahl der Patienten mit mindestens einem positiven Parameter (IgA, IgG, IgM).

\*p&lt;0,05

Die folgende Abbildung zeigt die prozentualen Anteile der seropositiven Patienten in den verschiedenen Altersgruppen in Abhängigkeit vom Geschlecht. Auffällig war bei den weiblichen Patienten der negative Trend von den jüngeren zu den älteren Patienten hin. Jüngere Patientinnen wiesen einen höheren Anteil an positiven Befunden auf als Ältere. Während sich zum Beispiel bei den 11 bis 20-jährigen Patientinnen fast 70 Prozent positive Befunde zeigten, lag der Anteil der seropositiven Patientinnen bei den 71 bis 80-jährigen nur noch bei 20 Prozent. Bei den Männern konnte allerdings ein solcher altersabhängiger Zusammenhang nicht gezeigt werden.

Auffällig war, dass bei männlichen Kindern und Jugendlichen der Anteil seropositiver Patienten wesentlich niedriger war als bei den weiblichen Patienten derselben Altersgruppe. So war zum Beispiel der Anteil seropositiver männlicher Patienten in der Altersgruppe der 0 bis 10-jährigen nur etwa halb so hoch wie bei den weiblichen Patienten (Abb. 10).

**Abb. 10:** Prozentualer Anteil seropositiver Patienten in den versch. Altersgruppen nach Geschlecht.



### 3.1.3.2 Positive Seren (nur IgA)

IgA-positive Seren konnten bei 16 von 327 (4,9%) der männlichen und bei 11 von 184 (5,8%) der weiblichen Patienten nachgewiesen werden. Insgesamt waren 27 der 513 untersuchten Proben positiv.

Bei den männlichen Patienten waren in der Gruppe 11 bis 20-jährigen 3 von 15 Proben (20%) positiv, womit diese Altersgruppe prozentual am häufigsten vertreten war. Bei den weiblichen Patienten waren die 31 bis 40-jährigen anteilmäßig mit 13,3 Prozent am häufigsten vertreten. Geschlechtunabhängig war die Gruppe der 11 bis 20-jährigen mit 13,0 Prozent am häufigsten vertreten. Eine alterabhängige Zu- oder Abnahme der IgA-positiven Seren ließ sich nicht erkennen (Tab. 11).

**Tab. 11:** ELISA: IgA-positive Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht.

Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
0-10	0 / 7	0,0	0 / 5	0,0	0 / 12	0,0
11-20	3 / 15	20,0	0 / 8	0,0	3 / 23	13,0
21-30	2 / 36	5,6	1 / 19	5,3	3 / 55	5,5
31-40	3 / 58	5,1	4 / 30	13,3	7 / 88	8,0
41-50	3 / 55	5,5	2 / 33	6,1	5 / 88	5,7
51-60	2 / 73	2,7	1 / 36	2,8	3 / 109	2,8
61-70	3 / 55	5,5	3 / 37	8,1	6 / 92	6,5
71-80	0 / 23	0,0	0 / 15	0,0	0 / 38	0,0
81-90	0 / 4	0,0	0 / 1	0,0	0 / 5	0,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	16 / 327	4,9	11 / 184	5,8	27 / 511	5,3

### 3.1.3.3 Positive Seren (nur IgM)

IgM-positive Seren konnten bei 12 von 328 (3,7%) der männlichen und bei 13 von 186 (7,0%) der weiblichen Patienten nachgewiesen werden. Insgesamt waren 25 der 514 untersuchten Proben positiv.

Bei den männlichen Patienten war die Gruppe der 81 bis 90-jährigen mit 25 Prozent anteilmäßig am größten, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, dass diese Altersgruppe nur vier Patienten umfasste und sich nur bei Einem ein positives Ergebnis fand. Bei den weiblichen Patienten waren die 0 bis 10-jährigen anteilmäßig mit 40,0 Prozent am häufigsten vertreten (2 von 12 Patienten). Tendenziell zeigte sich bei den IgM-positiven Seren wieder eine altersabhängige Tendenz. Mit zunehmendem Alter verminderte sich der prozentuale Anteil der seropositiven Patienten, was, mit Ausnahme der 81- bis 90-jährigen, insbesondere bei der geschlechtsunabhängigen Betrachtung auffiel (Tab. 12).

**Tab. 12:** ELISA: IgM-positive Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht.

Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
0-10	0 / 7	0,0	2 / 5	40,0	2 / 12	16,7
11-20	0 / 15	0,0	2 / 9	22,2	2 / 24	8,3
21-30	2 / 36	5,6	2 / 20	10,0	4 / 56	7,1
31-40	3 / 59	5,1	3 / 30	10,0	6 / 89	6,7
41-50	3 / 55	2,5	1 / 33	3,0	4 / 88	4,5
51-60	2 / 73	2,7	1 / 36	2,8	3 / 109	2,8
61-70	1 / 55	1,8	1 / 37	2,7	2 / 92	2,2
71-80	0 / 23	0,0	1 / 15	6,7	1 / 38	2,6
81-90	1 / 4	25,0	0 / 1	0,0	1 / 5	20,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	12 / 328	3,7*	13 / 186	7,0*	25 / 514	4,7

\*n.s.

#### 3.1.3.4 Positive Seren (nur IgG)

IgG war das am häufigsten im ELISA nachgewiesene Immunglobulin, wie weiter oben schon gezeigt worden war. 146 der 510 (28,6%) untersuchten Seren waren positiv. Bei den männlichen Patienten lag der Anteil der IgG-positiven Patienten bei 24,5 Prozent, bei den weiblichen Patienten bei der Anteil mit 35,9 Prozent deutlich höher.

Bei den männlichen Patienten war der Anteil der positiven Seren in allen Altersgruppen etwa gleichermaßen hoch. Bei den weiblichen Patienten zeigte sich eine alterabhängige Abnahme der prozentualen Häufigkeiten. Während bei den jüngeren Patienten bis 20 Jahre noch ca. 60 Prozent der untersuchten Seren positiv waren, lag dieser Anteil bei den über 60-jährigen unterhalb 30 Prozent.

**Tab. 13:** ELISA: IgG-positive Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht.

Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
0-10	2 / 7	28,6	3 / 5	60,0	5 / 12	41,7
11-20	4 / 15	26,7	5 / 8	62,5	9 / 23	39,1
21-30	10 / 36	27,8	9 / 19	47,4	19 / 55	34,5
31-40	18 / 58	31,0	13 / 30	43,3	31 / 88	35,2
41-50	13 / 55	23,6	12 / 33	36,4	25 / 88	28,4
51-60	12 / 72	16,7	11 / 36	30,6	23 / 108	21,3
61-70	15 / 55	27,3	10 / 37	27,0	25 / 92	27,2
71-80	5 / 23	21,7	3 / 15	20,0	8 / 38	21,1
81-90	1 / 4	25,0	0 / 1	0,0	1 / 5	20,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	80 / 326	24,5	66 / 184	35,9	146 / 510	28,6

## 3.2 Ergebnisse Neutralisationstest (NT)

### 3.2.1 Gesamtergebnis

Bei 522 Patienten wurde ein Neutralisationstest (NT) durchgeführt bzw. nach Coxsackie-Antigenen (B1, B2, B3, B4 und B5) gesucht. Als seropositiv galten alle Patienten, bei denen sich zumindest eines der fünf Antigene nachweisen ließ und der Titer dabei mindestens 80 betrug. Untersucht wurden die Seren von 334 männlichen und 188 weiblichen Patienten. Der Anteil seropositiver Patienten betrug bei den männlichen Patienten 61,7 Prozent und bei den weiblichen Patienten 68,1 Prozent. Insgesamt waren 334 der 522 Patienten (64,9%) seropositiv hinsichtlich eines oder mehrerer Antigene (Tab. 14 und Abb. 11).

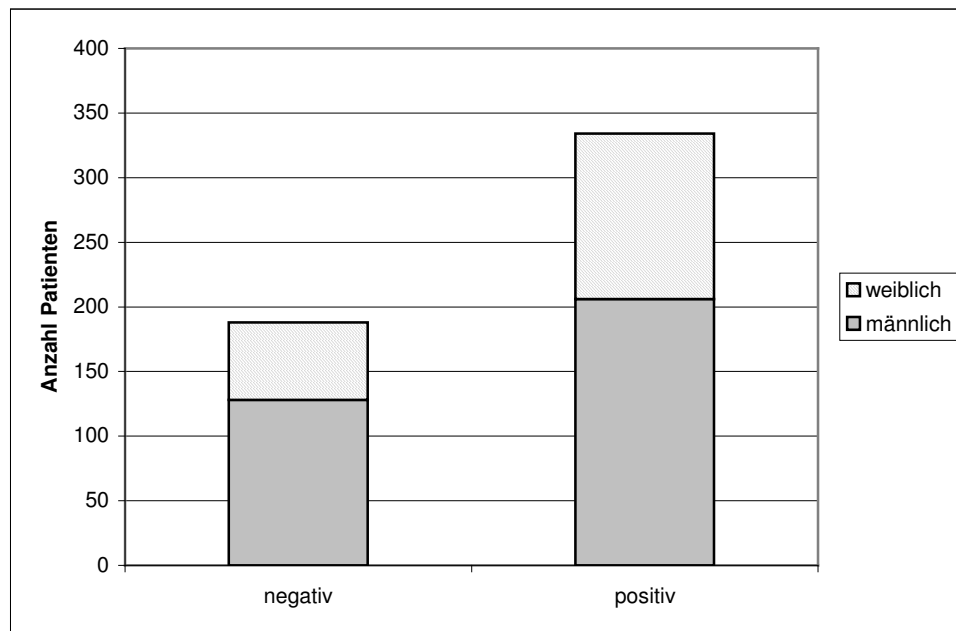
**Tab. 14:** Gesamtergebnis NT (B1, B2, B3, B4 und B5).

	negativ		positiv		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
männlich	128	38,3	206	61,7*	334	100
weiblich	60	31,9	128	68,1*	188	100
gesamt	188	36,0	334	64,0	522	100

Positiv : Mindestens ein Parameter (B1, B2, B3, B4, B5) positiv bzw. Titer mind. 80

Negativ: Alle Parameter (B1, B2, B3, B4, B5) negativ.

\*n.s.

**Abb. 11:** Gesamtergebnis NT (positiv vs. negativ).

Positiv : Mindestens ein Parameter (B1, B2, B3, B4, B5) positiv bzw. Titer mind. 80.

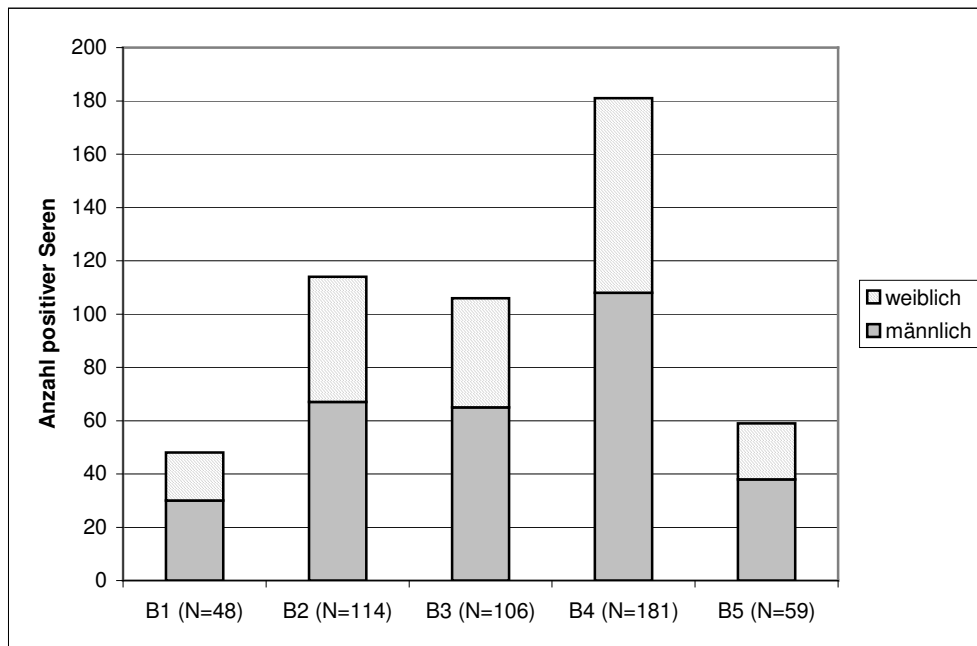
Negativ: Alle Parameter (B1, B2, B3, B4, B5) negativ.

### 3.2.2 NT nach Antigentyp

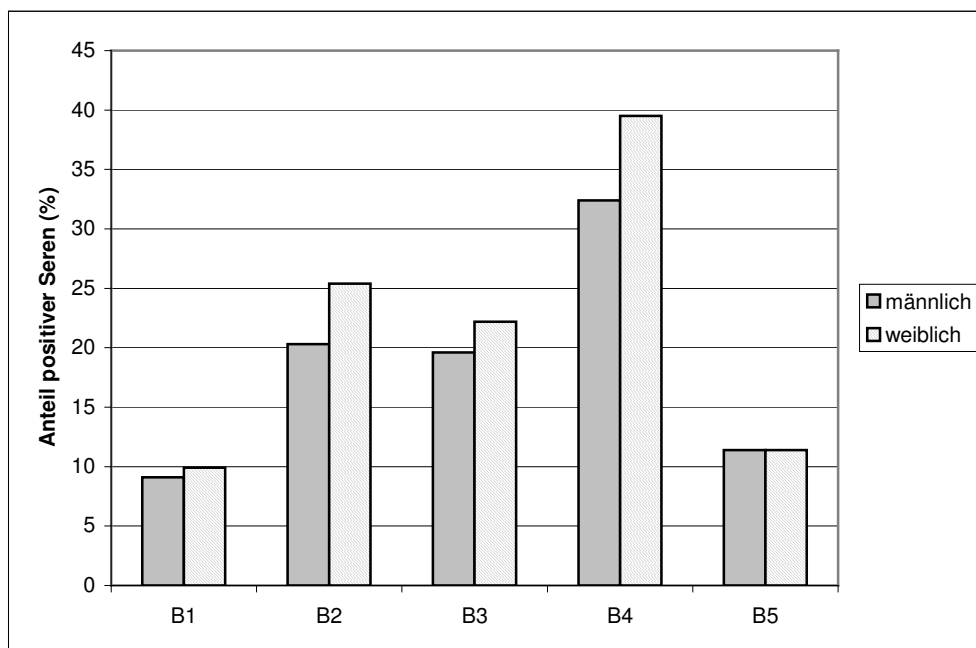
Unter den fünf Coxsackie-B-Antigenen konnten am häufigsten Antikörper gegen Cox-B4 nachgewiesen werden. 181 von 518 untersuchten Seren (34,9%) waren B4-positiv. Deutlich weniger Patienten waren B2- (N=114) und B3-positiv (N=106). Der prozen-

tuale Anteil der B2- und B3-positiven Seren lag bei 22,1 bzw. 20,5 Prozent. 59 von 517 Seren (11,4%) waren B5-positiv und 48 von 510 Seren (9,4%) B1-positiv. Der prozentuale Anteil der positiven Seren lag bei den weiblichen Patienten bei B1, B2, B3 und B4 etwas höher als bei den männlichen Patienten; Cox-B5 war bei beiden Geschlechtern prozentual gleich häufig (Abb. 12 und Abb. 13).

**Abb. 12:** NT: Anzahl positiver Seren nach Antigentyp (männlich+weiblich).





**Abb. 13:** NT: Anteil positiver Seren nach Antigentyp (B1-B5). Vergleich männlich/weiblich.

### 3.2.3 NT nach Altersgruppen

#### 3.2.3.1 Seropositive Patienten (B1, B2, B3, B4 oder B5)

Bei zwei Patienten fehlte die Altersangabe, so dass eine Zuordnung zu den Altersgruppen nicht möglich war. Insgesamt wiesen 333 der 520 untersuchten Patienten ein positives Ergebnis auf, d.h. mindestens eines der fünf Antigene war positiv bzw. wies einen Titer von 80 oder höher auf.

Prozentual am häufigsten fanden sich bei den männliche Patienten positive Befunde in der Altersgruppe der 0 bis 10-jährigen. Sechs von sieben männliche Patienten dieser Altergruppe waren seropositiv (85,7%). Bei den weiblichen Patienten fanden sich in der Gruppe der 31 bis 40-jährigen prozentual die meisten positiven Befunde. 26 von 32 Patientinnen waren in dieser Altersgruppe seropositiv (81,3%) (Tab. 15).

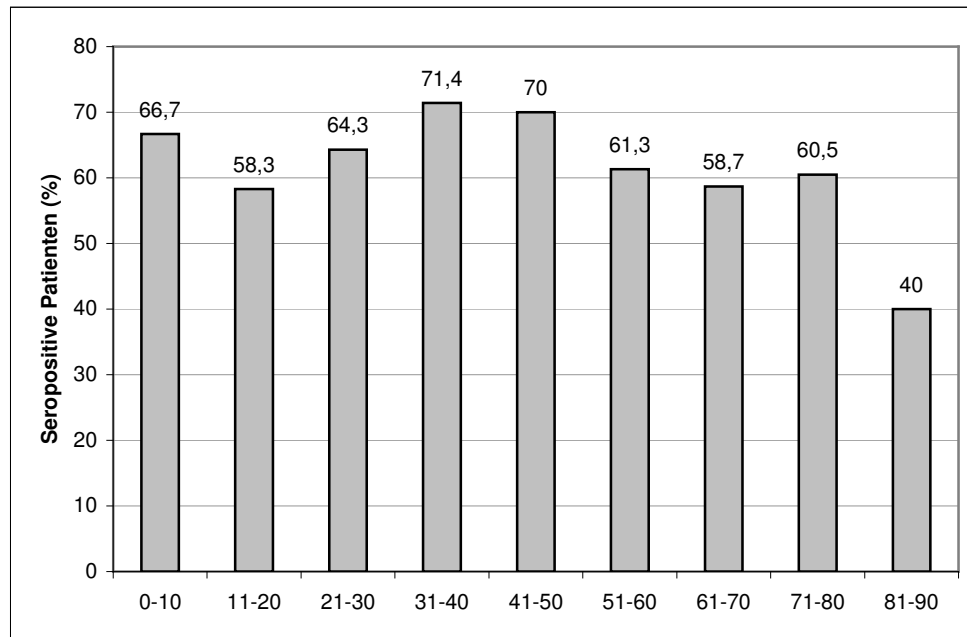
Eine altersabhängige Verteilung der seropositiven Patienten ließ sich nicht erkennen. In nahezu allen Altersgruppen lagen die Anteile der seropositiven Patienten zwischen 58,3 und 71,4 Prozent. Lediglich in der Altersgruppe der 81 bis 90-jährigen lag der Anteil bei nur 40 Prozent. In der höchsten Altersgruppe fanden sich überhaupt

keine seropositiven Patienten, wobei hier zu berücksichtigen ist, dass sich in dieser Altersgruppe nur ein einziger Patient befand (Abb. 14).

**Tab. 15:** NT: Seropositive Patienten (B1, B2, B3, B4 oder B5) nach Altersgruppen und Geschlecht.

Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N*	%	N*	%	N*	%
0-10	6 / 7	85,7	2 / 5	40	8 / 12	66,7
11-20	7 / 15	46,7	7 / 9	77,8	14 / 24	58,3
21-30	27 / 36	75,0	9 / 20	45,0	36 / 56	64,3
31-40	39 / 59	66,1	26 / 32	81,3	65 / 91	71,4
41-50	37 / 57	64,9	26 / 33	78,8	63 / 90	70,0
51-60	43 / 74	58,1	25 / 37	67,6	68 / 111	61,3
61-70	33 / 56	58,9	21 / 36	58,3	54 / 92	58,7
71-80	12 / 23	52,2	11 / 15	73,3	23 / 38	60,5
81-90	1 / 4	25,0	1 / 1	100	2 / 5	40,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	205 / 332	61,7	128 / 188	68,1	333 / 520	64,0

\*Anzahl der Patienten mit mindestens einem positiven Parameter (B1, B2, B3, B4, B5).

**Abb. 14:** Seropositive Patienten nach Altersgruppen.

Seropositiv=mindestens ein Parameter (B1, B2, B3, B4 oder B5) positiv.

### 3.2.3.2 Positive Seren nach Antigentyp

Der größte prozentuale Anteil Cox-B1-positiver Seren fand sich mit 13,3 Prozent (12 von 90) in der Altersgruppe der 61 bis 70-jährigen. Bei Cox-B2 fand sich der größte Anteil mit 29,2 Prozent (26 von 89) in der Altersgruppe der 31 bis 40-jährigen. Bei Cox-B3 waren prozentual betrachtet mit 41,7 Prozent (5 von 12) die 0 bis 10-jährigen am stärksten vertreten; bei Cox-B4 war es mit 45,6 Prozent (41 von 90) die Gruppe der 41 bis 50-jährigen, bei Cox-B5 mit 18,2 Prozent (10 von 55) die Gruppe der 21 bis 30-jährigen. Eine Altersabhängigkeit fand sich hinsichtlich keinem der fünf Cox-Antigenen (Tab. 16).

**Tab. 16:** NT: Anzahl positiver Seren nach Altersgruppen und Antigentyp.

Patienten- alter (Jahre)	Anzahl positiver Seren nach Antigen (Angaben in % in Klammern)				
	B1	B2	B3	B4	B5
0-10	0 / 12 (0,0)	2 / 12 (16,7)	5 / 12 (41,7)	3 / 12 (25,0)	2 / 12 (16,7)
11-20	3 / 23 (13,0)	4 / 23 (17,4)	7 / 23 (30,4)	9 / 23 (39,1)	4 / 24 (16,7)
21-30	2 / 54 (3,7)	6 / 54 (11,1)	9 / 55 (16,4)	19 / 56 (33,9)	10 / 55 (18,2)
31-40	7 / 87 (8,0)	26 / 89 (29,2)	28 / 89 (31,5)	32 / 89 (36,0)	11 / 89 (12,4)
41-50	10 / 8 (11,2)	18 / 90 (20,0)	18 / 90 (20,0)	41 / 90 (45,6)	10 / 90 (11,1)
51-60	10 / 110 (9,1)	27 / 110 (24,5)	20 / 111 (18,0)	40 / 110 (36,4)	8 / 111 (7,2)
61-70	12 / 90 (13,3)	22 / 92 (23,9)	12 / 91 (13,2)	26 / 92 (28,3)	11 / 91 (12,1)
71-80	4 / 37 (10,8)	7 / 37 (18,9)	7 / 38 (18,4)	10 / 38 (26,3)	3 / 37 (8,1)
81-90	0 / 5 (0,0)	1 / 5 (20,0)	0 / 5 (0,0)	1 / 5 (20,0)	0 / 5 (0,0)
91-100	0 / 1 (0,0)	0 / 1 (0,0)	0 / 1 (0,0)	0 / 1 (0,0)	0 / 1 (0,0)
gesamt	48 / 508 (9,5)	113 / 513 (22,0)	106 / 515 (20,6)	181 / 516 (35,1)	59 / 515 (11,5)

Die jeweils prozentual am stärksten vertretene Altersgruppe ist **markiert**.

### 3.2.3.3 Cox-B1

Cox-B1-positive Seren fanden sich bei den männlichen Patienten mit 9,2 Prozent (30 von 326) etwa gleich häufig wie bei den weiblichen Patienten mit 9,9 Prozent (18 von 182). Positive Befunde waren bei den männlichen Patienten mit 14,3 Prozent (8 von 56) am häufigsten in der Gruppe der 41 bis 50-jährigen nachzuweisen; bei den weiblichen Patienten war mit 14,7 Prozent (12 von 90) die Altersgruppe der 61 bis 70-jährigen prozentual am stärksten vertreten. Eine Alterabhängigkeit konnte nicht gezeigt werden (Tab. 17).

**Tab. 17:** NT: B1-positive Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht.

Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
0-10	0 / 7	0,0	0 / 5	0,0	0 / 12	0,0
11-20	2 / 15	13,3	1 / 8	12,5	3 / 23	13,0
21-30	1 / 34	2,9	1 / 20	5,0	2 / 54	3,7
31-40	3 / 57	5,3	4 / 30	13,3	7 / 87	8,0
41-50	8 / 56	14,3	2 / 32	6,1	10 / 89	11,2
51-60	7 / 73	9,6	3 / 37	8,1	10 / 110	9,1
61-70	7 / 56	12,5	5 / 34	14,7	12 / 90	13,3
71-80	2 / 23	8,7	2 / 14	14,3	4 / 37	10,8
81-90	0 / 4	0,0	0 / 1	0,0	0 / 5	0,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	30 / 326	9,2	18 / 182	9,9	48 / 508	9,5

Die jeweils prozentual am stärksten vertretene Altersgruppe ist **markiert**.

### 3.2.3.4 Cox-B2

Cox-B2-positive Seren fanden sich bei den männlichen Patienten mit 20,1 Prozent (66 von 328) etwas weniger häufig als bei den weiblichen Patienten mit 25,4 Prozent (47 von 185). Positive Befunde waren bei den männlichen Patienten mit 28,6 Prozent (2 von 7) am häufigsten in der Gruppe der 0 bis 10-jährigen nachzuweisen; bei den weiblichen Patienten war mit 37,5 Prozent (3 von 8) die Altersgruppe der 11 bis 20-jährigen prozentual am stärksten vertreten. Eine Alterabhängigkeit konnte nicht gezeigt werden (Tab. 18).

**Tab. 18:** NT: B2-positive Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht.

Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
0-10	2 / 7	28,6	0 / 5	0,0	2 / 12	16,7
11-20	1 / 15	6,7	3 / 8	37,5	4 / 23	17,4
21-30	5 / 34	14,7	1 / 20	5,0	6 / 54	11,1
31-40	16 / 58	27,6	10 / 31	32,3	26 / 89	29,2
41-50	7 / 57	12,3	11 / 33	33,3	18 / 90	20,0
51-60	17 / 73	23,3	10 / 37	27,0	27 / 110	24,5
61-70	12 / 56	21,4	10 / 36	27,8	22 / 92	23,9
71-80	5 / 23	21,7	2 / 14	14,3	7 / 37	18,9
81-90	1 / 4	25,0	0 / 1	0,0	1 / 5	20,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	66 / 328	20,1	47 / 185	25,4	113 / 513	22,0

Die jeweils prozentual am stärksten vertretene Altersgruppe ist **markiert**.

### 3.2.3.5 Cox-B3

Cox-B3-positive Seren fanden sich bei den männlichen Patienten mit 19,7 Prozent (65 von 330) in etwa gleich häufig wie bei den weiblichen Patienten mit 22,2 Prozent (41 von 185). Positive Befunde waren bei den männlichen Patienten mit 71,4 Prozent (5 von 7) am häufigsten in der Gruppe der 11bis 20-jährigen nachzuweisen; bei den weiblichen Patienten war mit 38,7 Prozent (12 von 31) die Altersgruppe der 31 bis 40-jährigen prozentual am stärksten vertreten. Eine Alterabhängigkeit konnte nicht gezeigt werden (Tab. 19).

**Tab. 19:** NT: B3-positive Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht.

Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
0-10	5 / 7	71,4	0 / 5	0,0	5 / 12	41,7
11-20	5 / 15	33,3	2 / 8	25,0	7 / 23	30,4
21-30	6 / 35	17,1	3 / 20	15,0	9 / 55	16,4
31-40	16 / 58	27,6	12 / 31	38,7	28 / 89	31,5
41-50	9 / 57	15,8	9 / 33	27,3	18 / 90	20,0
51-60	10 / 74	13,5	10 / 37	27,0	20 / 111	18,0
61-70	10 / 56	17,9	2 / 35	5,7	12 / 91	13,2
71-80	4 / 23	17,4	3 / 15	20,0	7 / 38	18,4
81-90	0 / 4	0,00	0 / 1	0,0	0 / 5	0,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	65 / 330	19,7	41 / 185	22,2	106 / 515	20,6

### 3.2.3.6 Cox-B4

Cox-B4-positive Seren fanden sich bei den männlichen Patienten mit 32,6 Prozent (108 von 331) etwas weniger häufig als bei den weiblichen Patienten mit 39,5 Prozent (73 von 185). Positive Befunde waren bei den männlichen Patienten mit 47,4 Prozent (27 von 57) am häufigsten in der Gruppe der 41 bis 50-jährigen nachzuweisen; bei den weiblichen Patienten war mit 50,0 Prozent (4 von 8) die Altersgruppe der 11 bis 20-jährigen prozentual am stärksten vertreten. Eine Alterabhängigkeit konnte nicht gezeigt werden (Tab. 20).

**Tab. 20:** NT: B4-positive Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht.

Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
0-10	1 / 7	14,3	2 / 5	40,0	3 / 12	25,0
11-20	5 / 15	33,3	4 / 8	50,0	9 / 23	39,1
21-30	11 / 36	30,6	8 / 20	40,0	19 / 56	33,9
31-40	20 / 59	33,9	12 / 30	40,0	32 / 89	36,0
41-50	27 / 57	47,4	14 / 33	42,4	41 / 90	45,6
51-60	23 / 73	31,5	17 / 37	45,9	40 / 110	36,4
61-70	16 / 56	28,6	10 / 36	27,8	26 / 92	28,3
71-80	5 / 23	21,7	5 / 15	33,3	10 / 38	26,3
81-90	0 / 4	0,0	1 / 1	100	1 / 5	20,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	108 / 331	32,6	73 / 185	39,5	181 / 516	35,1

### 3.2.3.7 Cox-B5

Cox-B5-positive Seren fanden sich bei den männlichen Patienten mit 11,5 Prozent (38 von 330) fast gleich häufig wie bei den weiblichen Patienten mit 11,4 Prozent (21 von 185). Positive Befunde waren bei den männlichen Patienten mit 28,6 Prozent (2 von 7) am häufigsten in der Gruppe der 0 bis 10-jährigen und der Gruppe der 21 bis 30-jährigen (10 von 35) nachzuweisen; bei den weiblichen Patienten war mit 33,3 Prozent (4 von 12) die Altersgruppe der 11 bis 20-jährigen prozentual am stärksten vertreten. Eine Alterabhängigkeit konnte nicht gezeigt werden (Tab. 21).

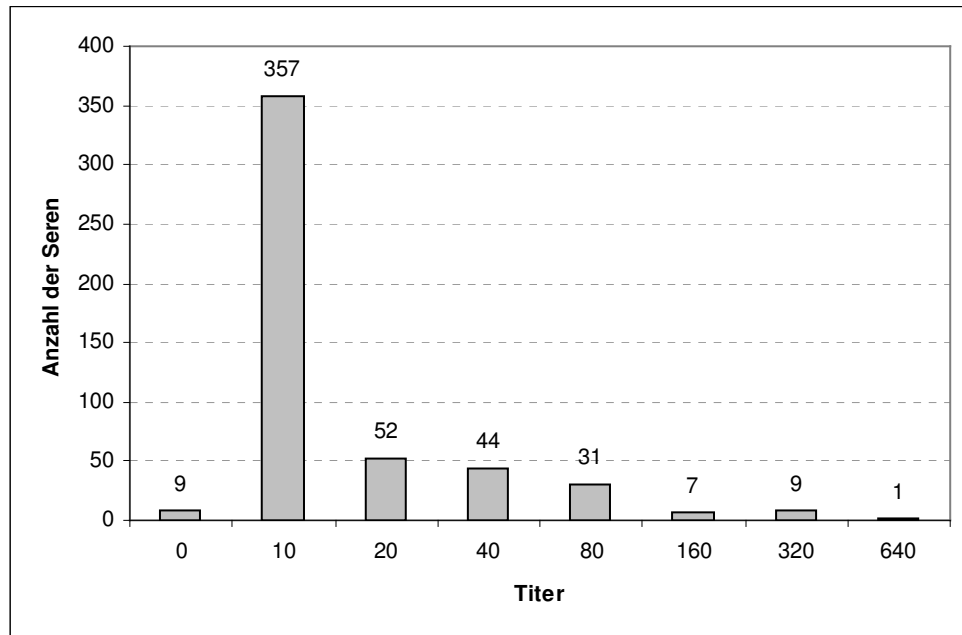
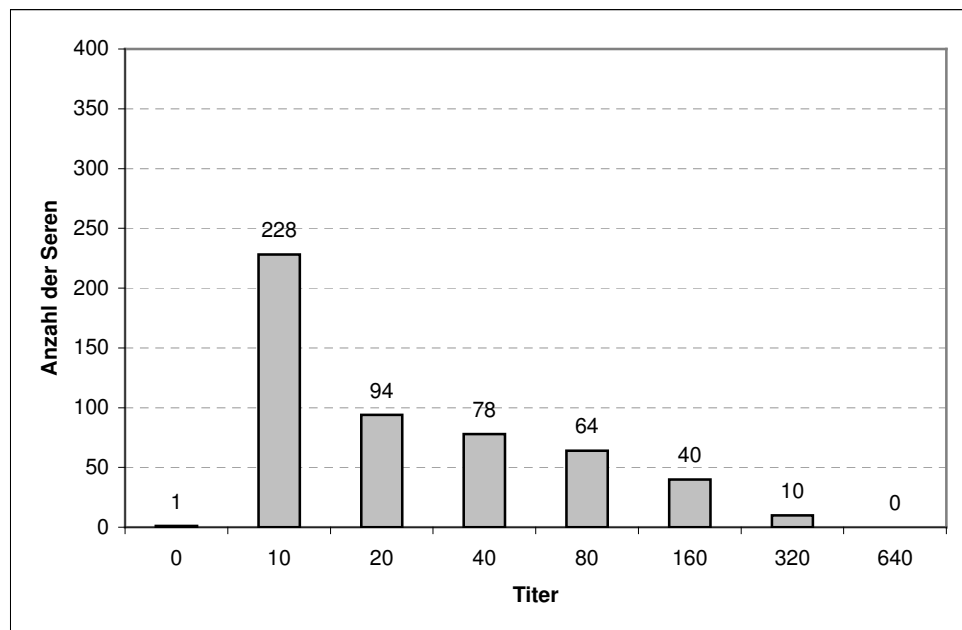


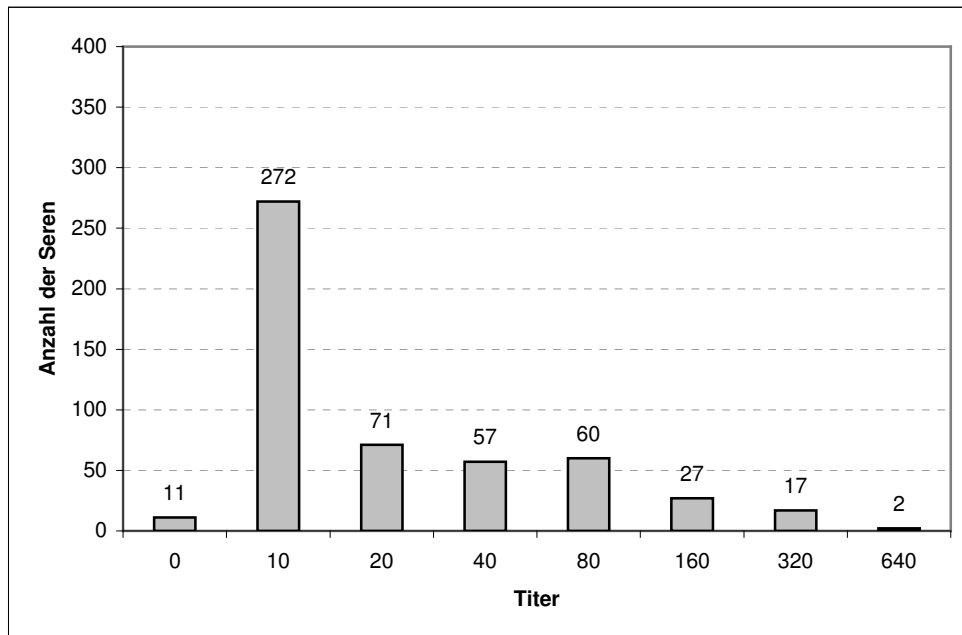
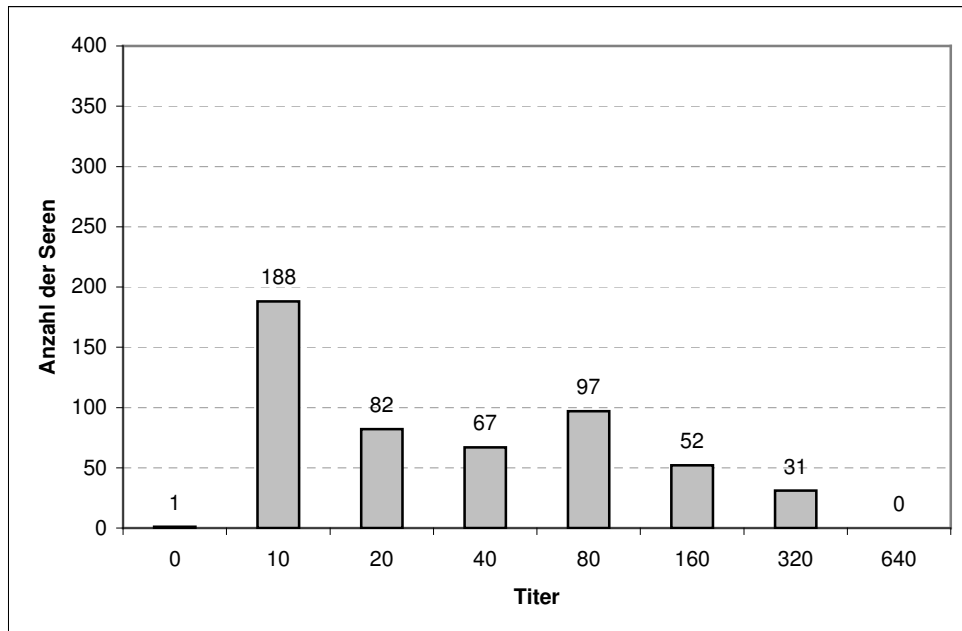
**Tab. 21:** NT: B5-positive Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht.

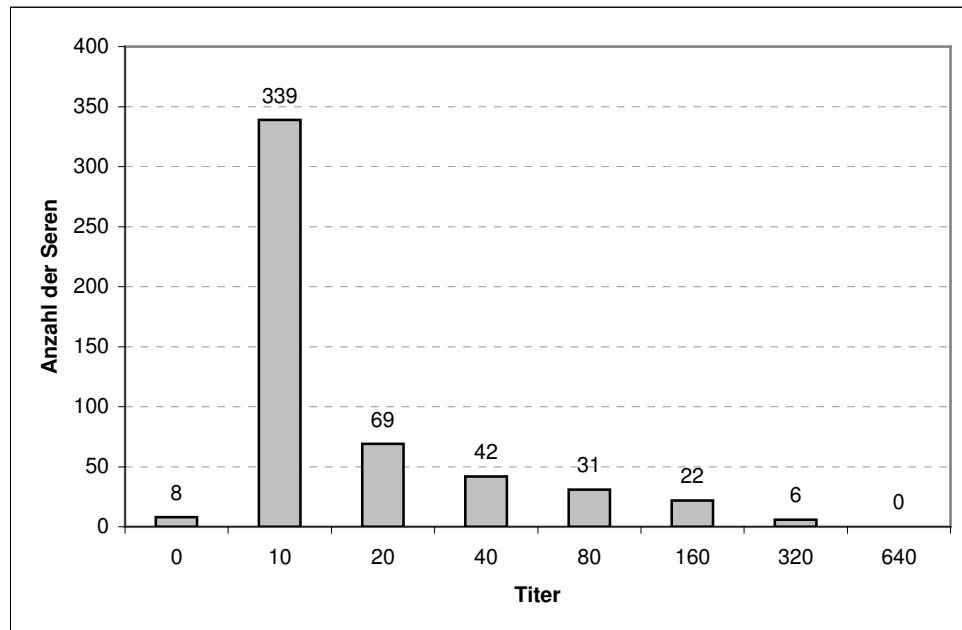
Patienten- alter (Jahre)	männlich		weiblich		gesamt	
	N	%	N	%	N	%
0-10	2 / 7	28,6	0 / 5	0,0	2 / 12	16,7
11-20	1 / 15	6,7	3 / 9	33,3	4 / 24	16,7
21-30	10 / 35	28,6	0 / 20	0,0	10 / 55	18,2
31-40	5 / 58	8,6	6 / 31	19,4	11 / 89	12,4
41-50	7 / 57	12,3	3 / 33	9,1	10 / 90	11,1
51-60	5 / 74	6,8	3 / 37	8,1	8 / 111	7,2
61-70	7 / 56	12,5	4 / 35	11,4	11 / 91	12,1
71-80	1 / 23	4,3	2 / 14	14,3	3 / 37	8,1
81-90	0 / 4	0,0	0 / 1	0,0	0 / 5	0,0
91-100	0 / 1	0,0	0 / 0	0,0	0 / 1	0,0
gesamt	38 / 330	11,5	21 / 185	11,4	59 / 515	11,5

### 3.2.4 NT nach Titer

Unter den fünf Coxsackie-Antigenen (B1-B5) war in allen Fällen der Antikörpertiter von 10 am häufigsten. Ein solcher Titer fand sich hinsichtlich B1 mit einem Anteil von 70,0 Prozent (357 von 510 untersuchten Proben). Für B2 lag dieser Anteil bei 44,3 Prozent (228 von 515), für B3 bei 52,6 Prozent (272 von 517), für B4 bei 36,3 Prozent (188 von 518) und für B5 bei 65,6 Prozent (339 von 517). Alle anderen Titer wurden deutlich seltener beobachtet und zeigten abfallende Häufigkeiten mit zunehmender Steigerung des Titers. Ein Titer von 640 wurde nur noch sehr vereinzelt beobachtet (Abb. 15 bis Abb. 19).

**Abb. 15:** NT (Cox-B1): Anzahl der Seren nach Titer.**Abb. 16:** NT (Cox-B2): Anzahl der Seren nach Titer.

**Abb. 17:** NT (Cox-B3): Anzahl der Seren nach Titer.**Abb. 18:** NT (Cox-B4): Anzahl der Seren nach Titer.

**Abb. 19:** NT (Cox-B5): Anzahl der Seren nach Titer.

### 3.3 Übereinstimmungen ELISA und NT (Grenztiter=80)

Von den 523 untersuchten Patienten wurde bei 522 ein NT und bei 517 ein ELISA durchgeführt. Positive Ergebnisse fanden sich im NT deutlich häufiger als im ELISA. Während beim NT 64 Prozent der untersuchten Patienten ein positives Ergebnis aufwiesen, fanden sich beim ELISA nur 33,8 Prozent seropositive Patienten. Bei 10,4 Prozent der Patienten war das ELISA grenzwertig (Tab. 22 und Abb. 20).

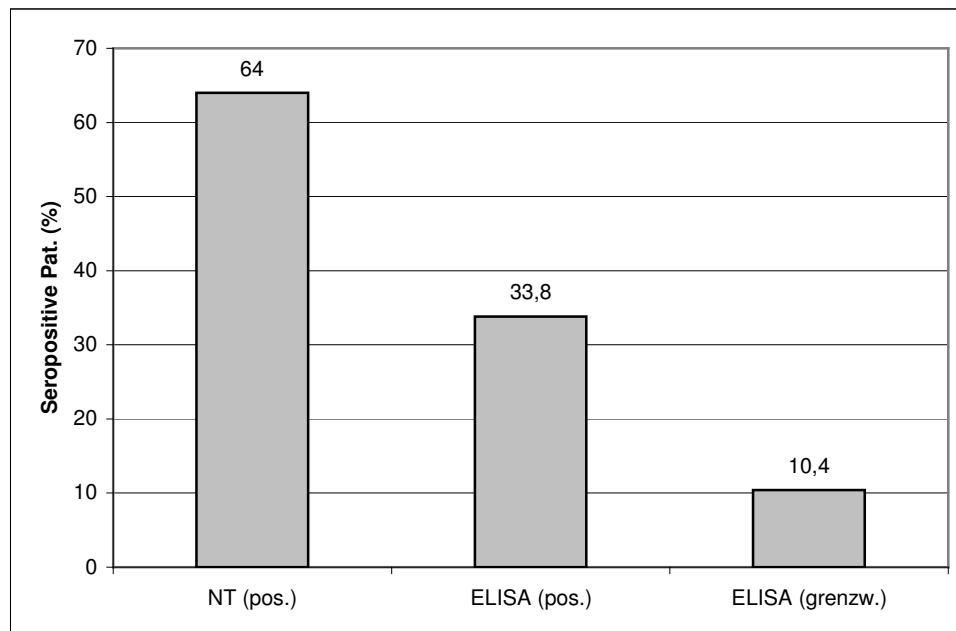
Als seropositiv wurden alle Patienten betrachtet, bei welchen im NT mindestens eines der fünf Antigene (B1-B5) einen Titer von 80 oder höher aufwies. Ferner wurden alle Patienten als seropositiv betrachtet, bei welchen im ELISA eines der drei Immunglobuline (IgA, IgG oder IgM) positiv war.

**Tab. 22:** Gesamtergebnisse von NT und ELISA im Vergleich.

	Neutralisationstest (NT) (N=522)*		ELISA (N=517)**		
	negativ	positiv	negativ	grenzwertig	positiv
Anzahl Patienten	188	334	288	54	175
Anteil (%)	36,0	64,0	55,7	10,4	33,8

\*fehlende Werte N=1

\*\*fehlende Werte N=6

**Abb. 20:** Seropositive Patienten: Vergleich NT und ELISA

### 3.3.1 Gesamtergebnis: ELISA (gesamt) und NT (gesamt)

Um zu überprüfen, inwiefern positive oder negative Ergebnisse im ELISA mit den positiven oder negativen Ergebnissen des NT übereinstimmen, wurden die beiden Gruppen miteinander verglichen.

Ergebnisse aus Sicht des NT:

Von den 329 positiven Ergebnissen des NT zeigten lediglich 35,0 Prozent (N=115) auch im ELISA ein positives Ergebnis. 55 Prozent der positiven NT-Resultate waren im ELISA negativ, 10,0 Prozent waren grenzwertig.

Von den 187 negativen Ergebnissen des NT war über die Hälfte (56,7%) auch im ELISA negativ, so dass sich in dieser Hinsicht die größere Übereinstimmung ergab. Andererseits wiesen 32,1 Prozent der NT-seronegativen Patienten im ELISA einen positiven Befund auf (Tab. 23).

**Tab. 23:** Ergebnisse des NT im Vergleich mit den Ergebnissen des ELISA.

NT (gesamt)	ELISA (gesamt)					
	negativ		grenzwertig		positiv	
	N	%	N	%	N	%
negativ (N=187)	106	56,7	21	11,2	60	32,1
positiv (N=329)	181	55,0	33	10,0	115	35,0

Ergebnisse aus Sicht des ELISA:

Von den 175 positiven Ergebnissen des ELISA zeigten immerhin 65,7 Prozent (N=115) auch ein positives Ergebnis im NT. Aus Sicht des ELISA ergab sich also die größere positive Übereinstimmung.

Von den 287 negativen Ergebnissen des ELISA war etwa ein Drittel (36,9%) auch im NT negativ. Umgekehrt wiesen 63,1 Prozent der ELISA-seronegativen Patienten im NT ein positives Ergebnis auf.

Von den 54 grenzwertigen ELISA-Befunden waren im NT 21 negativ (38,9%) und 33 positiv (61,1%) (Tab. 24).

**Tab. 24:** Ergebnisse des ELISA im Vergleich mit den Ergebnissen des NT.

ELISA (gesamt)	NT (gesamt)			
	negativ		positiv	
	N	%	N	%
negativ (N=287)	106	36,9	181	63,1
grenzwertig (N=54)	21	38,9	33	61,1
positiv (N=175)	60	34,3	115	65,7

Gesamtergebnis:

516 der 523 untersuchten Patienten konnten sowohl einem positiven oder negativen NT-Ergebnis als auch einem positiven oder negativen ELISA-Ergebnis zugeordnet werden. Davon wiesen 22,3 Prozent eine positive und 20,5 Prozent eine negative Übereinstimmung auf. Das heißt, 22,3 Prozent der 516 Patienten hatten sowohl im NT als auch im ELISA ein positives Ergebnis auf bzw. waren in beiden Tests seropositiv; 20,5 Prozent der Patienten waren weder im NT noch im ELISA seropositiv. Insgesamt ergab sich demnach eine Übereinstimmung der Resultate bei 42,8 Prozent der Patienten.

Bei fast der Hälfte der Patienten stimmten die Ergebnisse aus NT und ELISA nicht überein. In 46,7 Prozent der Fälle waren entweder NT positiv und gleichzeitig ELISA negativ oder aber NT negativ und gleichzeitig ELISA positiv.

Grenzwertige ELISA-Ergebnisse fanden sich bei 54 Patienten, wobei hiervon die meisten im NT positiv waren (33 positiv und 21 negativ) (Tab. 25).

**Tab. 25:** Übereinstimmungen NT (gesamt) und ELISA (gesamt).

Übereinstimmungen der Ergebnisse									
NT <u>und</u> ELISA positiv		NT <u>und</u> ELISA negativ		ELISA grenzwertig*		NT ungleich ELISA		gesamt	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
115	22,3	106	20,5	54	10,5	241	46,7	516	100

\*NT positiv (N=33) oder negativ (N=21).

### 3.3.2 ELISA (IgA) und NT (gesamt)

In Analogie zu den obigen Darstellungen wurden hier die Patienten mit IgA-positiven, -negativen oder -grenzwertigen Befunden im ELISA mit den NT-Befunden verglichen.

#### Ergebnisse aus Sicht des NT:

Von den 329 positiven Ergebnissen des NT zeigten im ELISA (IgA) 5,8 Prozent ein positives, 90,6 Prozent ein negatives und 3,6 Prozent ein grenzwertiges Ergebnis. Die negative Übereinstimmung lag aus Sicht des NT bei 95,1 Prozent; von den 183 negativen Ergebnissen des NT waren 174 auch im ELISA (IgA) negativ (Tab. 44).

**Tab. 26:** Ergebnisse des NT im Vergleich mit den Ergebnissen des ELISA (IgA).

NT (gesamt)	ELISA (IgA)					
	negativ		grenzwertig		positiv	
	N	%	N	%	N	%
negativ (N=183)	174	95,1	1	0,5	8	4,4
positiv (N=329)	298	90,6	12	3,6	19	5,8



Ergebnisse aus Sicht des ELISA (IgA):

Von den 27 positiven Ergebnissen des ELISA (IgA) zeigten 70,4 Prozent (N=19) auch im NT ein positives Ergebnis. Die negative Übereinstimmung lag aus Sicht des ELISA (IgA) bei 36,9 Prozent; von den 472 negativen ELISA-IgA-Ergebnissen waren 174 auch im NT negativ (Tab. 27).

**Tab. 27:** Ergebnisse des ELISA (IgA) im Vergleich mit den Ergebnissen des NT.

ELISA (IgA)	NT (gesamt)			
	negativ		positiv	
	N	%	N	%
negativ (N=472)	174	36,9	298	63,1
grenzwertig (N=13)	1	7,7	12	92,3
positiv (N=27)	8	29,6	19	70,4

Gesamtergebnis:

512 der 523 untersuchten Patienten konnten sowohl einem NT-Ergebnis als auch einem ELISA-IgA-Ergebnis zugeordnet werden. Davon wiesen 3,7 Prozent eine positive und 34,0 Prozent eine negative Übereinstimmung auf. Das heißt, 3,7 Prozent der 512 Patienten wiesen sowohl im NT als auch im ELISA (IgA) ein positives Ergebnis auf bzw. waren in beiden Tests seropositiv; 34,0 Prozent der Patienten waren weder im NT noch im ELISA (IgA) seropositiv. Insgesamt ergab sich demnach eine Übereinstimmung der Resultate bei 37,7 Prozent der Patienten.

Bei über der Hälfte der Patienten stimmten die Ergebnisse aus NT und ELISA (IgA) nicht überein. In 59,8 Prozent der Fälle waren entweder NT positiv und gleichzeitig ELISA (IgA) negativ oder aber NT negativ und gleichzeitig ELISA (IgA) positiv.

Grenzwertige ELISA-Ergebnisse fanden sich bei 13 Patienten, wobei hiervon die meisten im NT positiv waren (12 positiv und 1 negativ) (Tab. 28).

**Tab. 28:** Übereinstimmungen NT (gesamt) und ELISA (IgA).

Übereinstimmungen der Ergebnisse Vergleich NT (gesamt) und ELISA (IgA)									
NT <u>und</u> ELISA positiv		NT <u>und</u> ELISA negativ		ELISA grenzwertig*		NT ungleich ELISA		gesamt	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
19	3,7	174	34,0	13	2,5	306	59,8	512	100

\*NT positiv (N=12) oder negativ (N=1).

### 3.3.3 ELISA (IgG) und NT (gesamt)

In Analogie zu den obigen Darstellungen wurden hier die Patienten mit IgG-positiven, -negativen oder -grenzwertigen Befunden im ELISA mit den NT-Befunden verglichen.

#### Ergebnisse aus Sicht des NT:

Von den 328 positiven Ergebnissen des NT zeigten im ELISA (IgG) 63,1 Prozent ein positives, 30,2 Prozent ein negatives und 6,7 Prozent ein grenzwertiges Ergebnis. Die negative Übereinstimmung lag aus Sicht des NT bei 63,4 Prozent; von den 183 negativen Ergebnissen des NT waren 116 auch im ELISA (IgG) negativ (Tab. 29).

**Tab. 29:** Ergebnisse des NT im Vergleich mit den Ergebnissen des ELISA (IgG).

NT (gesamt)	ELISA (IgG)					
	negativ		grenzwertig		positiv	
	N	%	N	%	N	%
negativ (N=183)	116	63,4	20	10,9	47	25,7
positiv (N=328)	207	63,1	22	6,7	99	30,2

Ergebnisse aus Sicht des ELISA (IgG):

Von den 146 positiven Ergebnissen des ELISA (IgG) zeigten 67,8 Prozent (N=99) auch im NT ein positives Ergebnis. Die negative Übereinstimmung lag aus Sicht des ELISA (IgG) bei 35,9 Prozent; von den 323 negativen ELISA-IgG-Ergebnissen waren 116 auch im NT negativ (Tab. 30).

**Tab. 30:** Ergebnisse des ELISA (IgG) im Vergleich mit den Ergebnissen des NT.

ELISA (IgG)	NT (gesamt)			
	negativ		positiv	
	N	%	N	%
negativ (N=323)	116	35,9	207	64,1
grenzwertig (N=42)	20	47,6	22	52,4
positiv (N=146)	47	32,2	99	67,8

Gesamtergebnis:

511 der 523 untersuchten Patienten konnten sowohl einem NT-Ergebnis als auch einem ELISA-IgG-Ergebnis zugeordnet werden. Davon wiesen 19,4 Prozent eine positive und 22,7 Prozent eine negative Übereinstimmung auf. Das heißt, 19,4 Prozent der 511 Patienten wiesen sowohl im NT als auch im ELISA (IgG) ein positives Ergebnis auf bzw. waren in beiden Tests seropositiv; 22,7 Prozent der Patienten waren weder im NT noch im ELISA (IgG) seropositiv. Insgesamt ergab sich demnach eine Übereinstimmung der Resultate bei 42,1 Prozent der Patienten.

Bei etwa der Hälfte der Patienten stimmten die Ergebnisse aus NT und ELISA (IgG) nicht überein. In 49,7 Prozent der Fälle waren entweder NT positiv und gleichzeitig ELISA (IgG) negativ oder aber NT negativ und gleichzeitig ELISA (IgG) positiv.

Grenzwertige ELISA-Ergebnisse fanden sich bei 42 Patienten (22 im NT positiv und 20 im NT negativ) (Tab. 31).

**Tab. 31:** Ergebnisse des NT im Vergleich mit den Ergebnissen des ELISA (IgG).

Übereinstimmungen der Ergebnisse Vergleich NT (gesamt) und ELISA (IgG)									
NT <u>und</u> ELISA positiv		NT <u>und</u> ELISA negativ		ELISA grenzwertig*		NT ungleich ELISA		gesamt	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
99	19,4	116	22,7	42	8,2	254	49,7	511	100

\*NT positiv (N=22) oder negativ (N=20).

### 3.3.4 ELISA (IgM) und NT (gesamt)

In Analogie zu den obigen Darstellungen wurden hier die Patienten mit IgM-positiven, -negativen oder -grenzwertigen Befunden im ELISA mit den NT-Befunden verglichen.

#### Ergebnisse aus Sicht des NT:

Von den 328 positiven Ergebnissen des NT zeigten im ELISA (IgM) nur 4,9 Prozent ein positives, 91,2 Prozent ein negatives und 4,0 Prozent ein grenzwertiges Ergebnis (Tab. 32). Bei der Interpretation des geringen Anteils der positiven ELISA-IgM-Befunde ist zu berücksichtigen, dass insgesamt nur sehr wenige Patienten positive IgM-Werte aufwiesen (N=25), und dass von diesen 25 Patienten weit über die Hälfte (N=16) auch positive NT-Werte aufwiesen. Dies spiegelt sich bei der Betrachtung der Ergebnisse aus Sicht des ELISA (IgM) wider (Tab. 33).

Die negative Übereinstimmung lag aus Sicht des NT bei 90,4 Prozent; von den 187 negativen Ergebnissen des NT waren 169 auch im ELISA (IgM) negativ (Tab. 32).

**Tab. 32:** Ergebnisse des NT im Vergleich mit den Ergebnissen des ELISA (IgM).

NT (gesamt)	ELISA (IgM)					
	negativ		grenzwertig		positiv	
	N	%	N	%	N	%
negativ (N=187)	169	90,4	9	4,8	9	4,8
positiv (N=328)	299	91,2	13	4,0	16	4,9

Ergebnisse aus Sicht des ELISA (IgM):

Von den 25 positiven Ergebnissen des ELISA (IgM) zeigten 64,0 Prozent (N=16) auch im NT ein positives Ergebnis. Die negative Übereinstimmung lag aus Sicht des ELISA (IgM) bei 36,1 Prozent vor; von den 468 negativen ELISA-IgM-Ergebnissen waren 169 auch im NT negativ (Tab. 33).

**Tab. 33:** Ergebnisse des ELISA (IgM) im Vergleich mit den Ergebnissen des NT.

ELISA (IgM)	NT (gesamt)			
	negativ		positiv	
	N	%	N	%
negativ (N=468)	169	36,1	299	63,9
grenzwertig (N=22)	9	40,9	13	59,1
positiv (N=25)	9	36,0	16	64,0

Gesamtergebnis:

515 der 523 untersuchten Patienten konnten sowohl einem NT-Ergebnis als auch einem ELISA-IgM-Ergebnis zugeordnet werden. Davon wiesen 3,1 Prozent eine positive und 32,8 Prozent eine negative Übereinstimmung auf. Das heißt, 3,1 Prozent der 515 Patienten wiesen sowohl im NT als auch im ELISA (IgM) ein positives Ergebnis auf bzw.

waren in beiden Tests seropositiv; 32,8 Prozent der Patienten waren weder im NT noch im ELISA (IgM) seropositiv. Insgesamt ergab sich demnach eine Übereinstimmung der Resultate bei 35,9 Prozent der Patienten.

Bei über der Hälfte der Patienten stimmten die Ergebnisse aus NT und ELISA (IgM) nicht überein. In 59,8 Prozent der Fälle waren entweder NT positiv und gleichzeitig ELISA (IgM) negativ oder aber NT negativ und gleichzeitig ELISA (IgM) positiv.

Grenzwertige ELISA-Ergebnisse fanden sich bei 21 Patienten (13 im NT positiv und 9 im NT negativ) (Tab. 34).

**Tab. 34:** Ergebnisse des NT im Vergleich mit den Ergebnissen des ELISA (IgM).

Übereinstimmungen der Ergebnisse Vergleich NT (gesamt) und ELISA (IgM)									
NT <u>und</u> ELISA positiv		NT <u>und</u> ELISA negativ		ELISA grenzwer- tig*		NT ungleich ELISA		gesamt	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
16	3,1	169	32,8	22	4,3	308	59,8	515	100

\*NT positiv (N=13) oder negativ (N=9).

### 3.4 Übereinstimmungen ELISA und NT (Grenztiter=160)

Um zu überprüfen, welchen Einfluss der NT-Grenztiter auf die Ergebnisse hat, wurde für einen Teil der Berechnungen der Grenztiter von 80 auf 160 erhöht. Als Grenztiter ist jener Wert bezeichnet, bei welchem im NT von einem positiven Befund ausgegangen wurde. In diesem Fall wurden also all jene Patienten hinsichtlich des NT als seropositiv bezeichnet, bei denen zumindest eines der fünf Cox-B-Antigene (B1-B5) einen AK-Titer von mindestens 160 aufwies. Hinsichtlich des ELISA wurden, wie gehabt, jene Patienten als seropositiv betrachtet, bei denen eines der drei Immunglobuline (IgA, IgG oder IgM) positiv war.

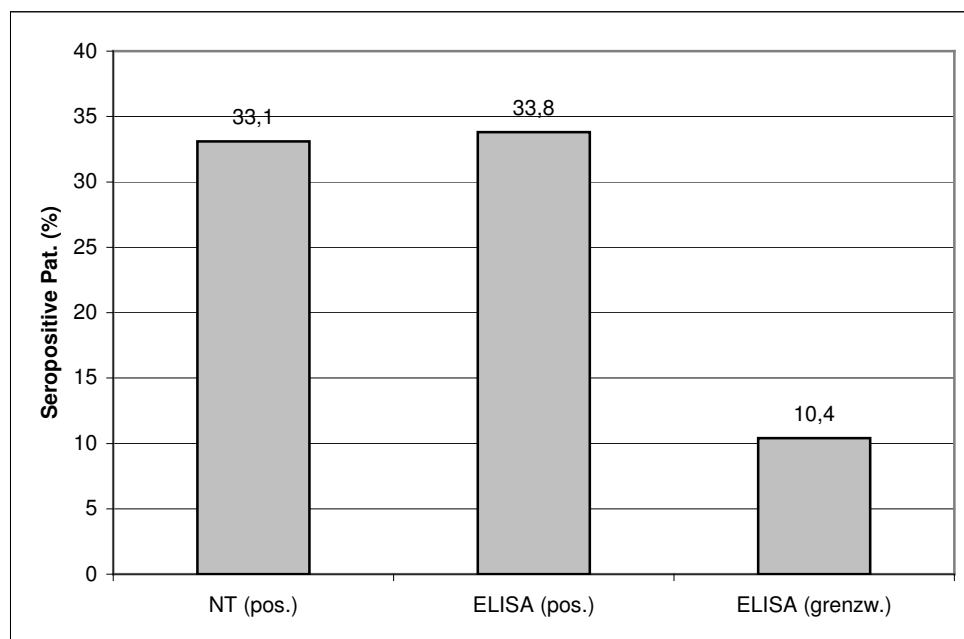
Im Gegensatz zum NT-Grenztiter von 80, bei welchem 64 Prozent der Patienten als seropositiv erkannt wurden, waren beim NT-Grenztiter von 160 nur noch 33,1 Prozent

der Patienten seropositiv. Der Anteil der seropositiven Patienten glich sich folglich dem Ergebnis des ELISA an, bei welchem der Anteil von 33,8 Prozent ein positives Ergebnis zeigte (Tab. 35 und Abb. 21).

**Tab. 35:** Gesamtergebnis von NT und ELISA im Vergleich (NT-Grenztiter=160).

	Neutralisationstest (NT) (N=522)		ELISA (N=517)		
	negativ	positiv	negativ	grenzwertig	positiv
Anzahl Patienten	349	173	288	54	175
Anteil (%)	66,9	33,1	55,7	10,4	33,8

**Abb. 21:** Seropositive Patienten: Vergleich NT und ELISA (NT-Grenztiter=160).



NT positiv = Titer B1, B2, B3, B4 oder B5 mind. 160.

ELISA positiv = IgA, IgG oder IgM positiv

### 3.4.1 Gesamtergebnis: ELISA und NT

Um zu überprüfen, inwiefern positive oder negative Ergebnisse im ELISA mit den positiven oder negativen Ergebnissen des NT übereinstimmen, wurden wiederum die beiden Gruppen aus Sicht des NT sowie aus Sicht des ELISA miteinander verglichen.

#### Ergebnisse aus Sicht des NT:

Von den 170 positiven Ergebnissen des NT zeigten 38,2 Prozent (N=65) auch im ELISA ein positives Ergebnis. Dieses Resultat gleicht in etwa jenen Daten, wie sie sich beim NT-Grenztiter von 80 ergeben hatten; der Anteil ELISA-positiver Patienten betrug hier 35,0 Prozent (Tab. 36).

**Tab. 36:** Ergebnisse des NT (Grenztiter 160) mit den Ergebnissen des ELISA.

NT (gesamt)	ELISA (gesamt)					
	negativ		grenzwertig		positiv	
	N	%	N	%	N	%
negativ (N=346)	196	56,6	40	11,6	110	31,8
positiv (N=170)	91	53,5	14	8,2	65	38,2

#### Ergebnisse aus Sicht des ELISA:

Von den 175 positiven Ergebnissen des ELISA zeigten jetzt nur noch 37,1 Prozent (N=65) auch ein positives Ergebnis im NT. Beim NT-Grenztiter von 80 waren es noch 65,7 Prozent (N=115 von 175) gewesen. Die Korrelation der negativen Ergebnisse erhöhte sich von 36,9 Prozent (beim NT-Grenzwert von 80) auf nun 68,3 Prozent. Konkret hatten von den 287 Patienten, die im ELISA ein negatives Ergebnis aufwiesen, 196 Patienten auch im NT ein negatives Ergebnis (Tab. 37).



**Tab. 37:** Ergebnisse des ELISA im Vergleich mit den Ergebnissen des NT (Grenztiter 160).

ELISA (gesamt)	NT (gesamt)			
	negativ		positiv	
	N	%	N	%
negativ (N=287)	196	68,3	91	31,7
grenzwertig (N=54)	40	74,1	14	25,9
positiv (N=175)	110	62,9	65	37,1

Gesamtergebnis:

516 der 523 untersuchten Patienten konnten sowohl einem positiven oder negativen NT-Ergebnis als auch einem positiven oder negativen ELISA-Ergebnis zugeordnet werden. Davon wiesen beim NT-Grenztiter von 160 nur noch 12,6 Prozent (statt 22,3) eine positive Übereinstimmung auf. Das heißt, nur noch 12,6 Prozent der 516 Patienten hatten sowohl im NT als auch im ELISA ein positives Ergebnis bzw. waren in beiden Tests seropositiv.

Die negative Übereinstimmung erhöhte sich von 20,5 Prozent beim NT-Grenztiter von 80 auf nun 38,0 Prozent beim größeren NT-Grenztiter von 160. 196 (statt 106) der 516 der Patienten waren weder im NT noch im ELISA seropositiv.

Insgesamt ergab sich eine Übereinstimmung im positiven sowie im negativen Sinne bei 50,6 Prozent der Patienten. Beim NT-Grenzwert von 80 lag diese Übereinstimmung bei 42,8 Prozent.

Bei 39,0 Prozent der Patienten stimmten die Ergebnisse aus NT und ELISA nicht überein, d.h. entweder waren NT positiv und gleichzeitig ELISA negativ oder aber NT negativ und gleichzeitig ELISA positiv. Beim NT-Grenztiter von 80 betrug dieser Anteil 47,7 Prozent (Tab. 38).

**Tab. 38:** Ergebnisse des NT (Grenztiter 160) im Vergleich mit den Ergebnissen des ELISA (gesamt).

Übereinstimmungen der Ergebnisse									
NT <u>und</u> ELISA positiv		NT <u>und</u> ELISA negativ		ELISA grenzwertig*		NT ungleich ELISA		gesamt	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
65	12,6	196	38,0	54	10,5	201	39,0	516	100

\*NT positiv (N=14) oder negativ (N=40).

### 3.5 Übereinstimmungen ELISA und NT (versch. Grenztiter)

Legt man als Grenze für einen positiven Befund im NT einen Titer von 20 zugrunde, so ergibt sich eine Zahl von 483 seropositiven Patienten. Mit steigendem Grenztiter reduziert sich die Zahl der seropositiven Patienten von 429 bei einem Titer von mindestens 40 auf 69 Patienten bei einem Titer von 320 oder höher. Die Verminderung der Zahl der seropositiven Patienten ergibt sich aus der zunehmenden Messgenauigkeit bzw. der Abnahme möglicher falsch positiver Ergebnisse im NT. Zu erwarten wäre, dass sich mit zunehmender Messgenauigkeit bzw. mit zunehmendem NT-Titer auch der Anteil der positiven Übereinstimmungen mit dem ELISA erhöht. Diese Erwartung erfüllte sich jedoch nicht. Bei allen zugrunde gelegten Grenztitern von 20 bis 320 blieb der Anteil der positiven Befunde im ELISA fast gleich und lag bei ca. 35 Prozent. Eine Korrelation zwischen NT und ELISA bestand demnach offensichtlich nicht. Unabhängig vom NT-Grenztiter scheint der Anteil der Patienten mit positiven Befunden im ELISA stets gleich groß zu sein (Tab. 39). Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in den nachfolgenden Darstellungen und Berechnungen wider (Kap. 3.6 ff.).

**Tab. 39:** Anzahl ELISA-positiver Patienten in Abhängigkeit vom NT-Titer.

NT-Titer (maximaler Wert aus B1-B5)	NT Seropositive Patienten (N)	davon IgA, IgG oder IgM-positiv	
		N	%
mind. 20	483	162 / 477*	34,0
mind. 40	429	148 / 423*	35,0
mind. 80	329	115 / 329	35,0
mind. 160	173	65 / 170*	38,2
mind. 320	69	25 / 68*	36,8

\*fehlende ELISA-Werte.

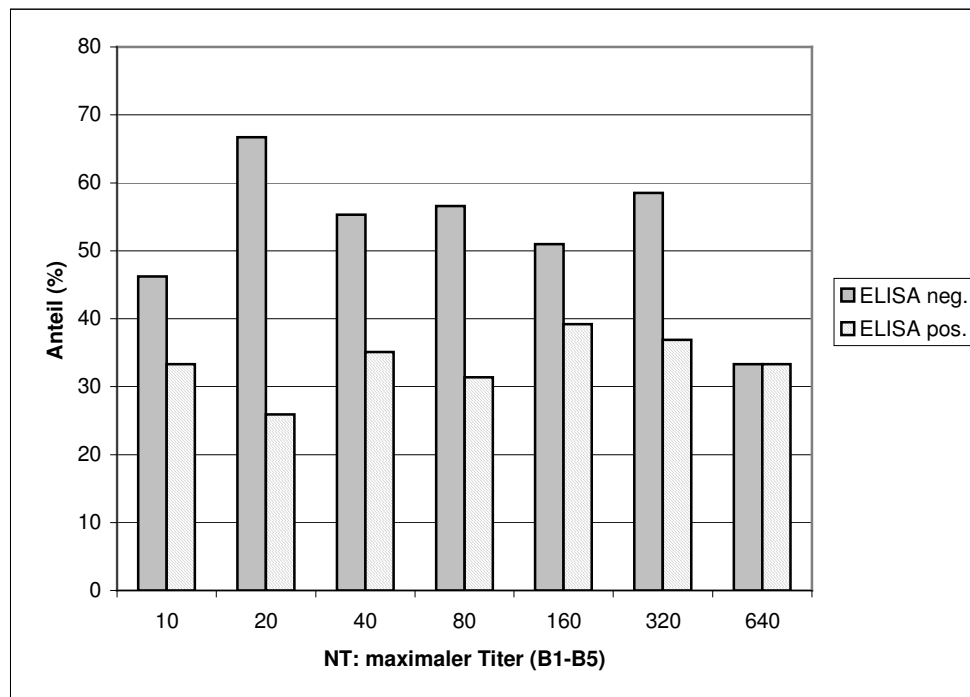
### 3.6 ELISA-Ergebnisse in Abhängigkeit vom NT-Titer

#### 3.6.1 ELISA (gesamt)

Für alle NT-Titer-Stufen ergaben sich prozentual ähnliche Anteile an positiven ELISA-Ergebnissen. Die Anteile lagen für alle Titer zwischen 25,9 und 39,2 Prozent. Eine NT-Titer-abhängige Veränderung der positiven ELISA-Werte konnte demnach nicht beobachtet werden (Tab. 40 und Abb. 22).

**Tab. 40:** ELISA in Abhängigkeit von NT-Titern.

NT (jeweils höchster Titer aus B1-B5)	ELISA (gesamt)					
	negativ		grenzwertig		positiv	
	N	%	N	%	N	%
10 (N=39)	18	46,2	8	20,5	13	33,3
20 (N=54)	36	66,7	4	7,4	14	25,9
40 (N=94)	52	55,3	9	9,6	33	35,1
80 (N=159)	90	56,6	19	11,9	50	31,4
160 (N=102)	52	51,0	10	9,8	40	39,2
320 (N=65)	38	58,5	3	4,6	24	36,9
640 (N=3)	1	33,3	1	33,3	1	33,3
gesamt (N=516)	287	55,6	54	10,5	175	33,9

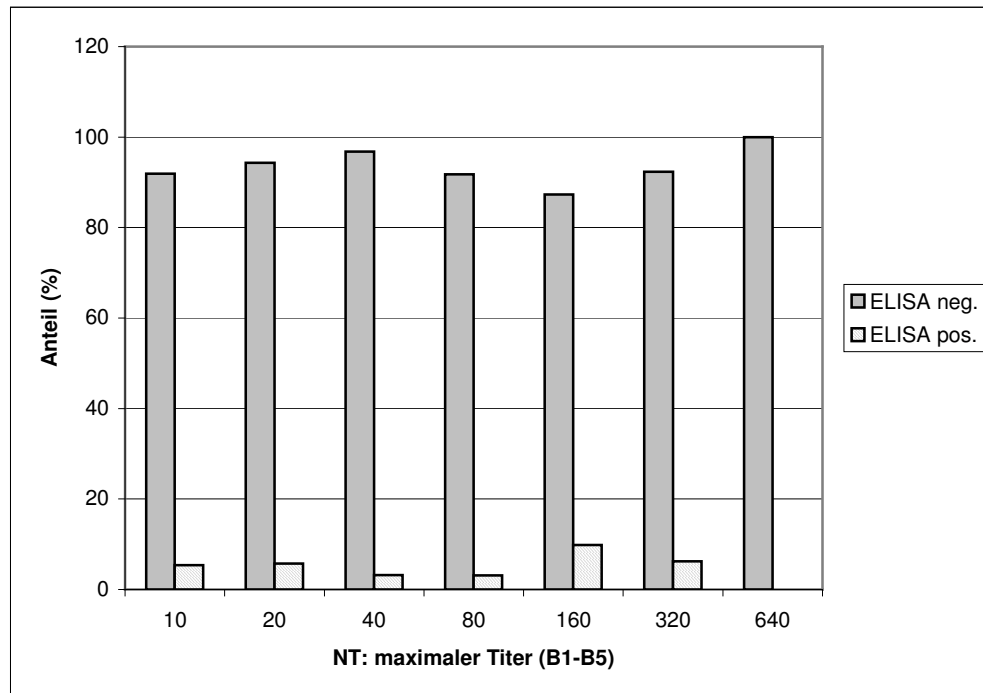
**Abb. 22:** ELISA in Abhängigkeit der NT-Titer.

### 3.6.2 ELISA (IgA)

Wie auch beim ELISA-Gesamtergebnis konnte auch für ELISA-IgA keine Abhängigkeit der positiven oder negativen Befunde vom NT-Titer beobachtet werden. Der mittlere Anteil der positiven ELISA-Befunde lag bei 5,3 Prozent und schwankte zwischen null und 9,8 Prozent. Die häufigsten positiven ELISA-Werte fanden sich beim NT-Titer von 160, die niedrigsten beim Titer von 320 (Tab. 41 und Abb. 23).

**Tab. 41:** ELISA-IgA in Abhängigkeit der NT-Titer.

NT (jeweils höchster Titer aus B1-B5)	ELISA (IgA)					
	negativ		grenzwertig		positiv	
	N	%	N	%	N	%
10 (N=37)	34	91,9	1	2,7	2	5,4
20 (N=53)	50	94,3	0	0,0	3	5,7
40 (N=93)	90	96,8	0	0,0	3	3,2
80 (N=159)	146	91,8	8	5,0	5	3,1
160 (N=102)	89	87,3	3	2,9	10	9,8
320 (N=65)	60	92,3	1	1,5	4	6,2
640 (N=3)	3	100	0	0,0	0	0,0
gesamt (512)	472	92,2	13	2,5	27	5,3

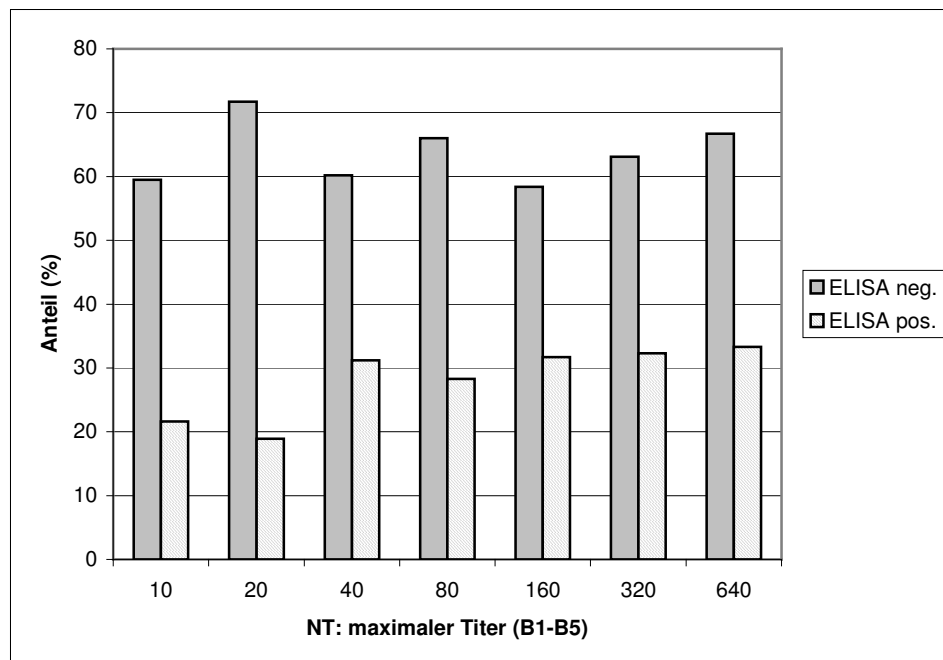
**Abb. 23:** ELISA-IgA in Abhängigkeit der NT-Titer.

### 3.6.3 ELISA (IgG)

Auch beim ELISA-IgG konnte keine eindeutige Abhängigkeit vom NT-Titer gezeigt werden. Allerdings konnte ab dem NT-Titer von 80 ein zunehmender Anteil positiver ELISA-Befunde beobachtet werden (Tab. 42). Ein eindeutiger Trend ergab sich jedoch nicht, wie sich sehr gut bei Betrachtung der Grafik erkennen lässt (Abb. 24). Eine Abnahme der negativen ELISA-Befunde mit zunehmendem NT-Titer konnte auch in Ansätzen nicht gezeigt werden (Tab. 42 und Abb. 24).

**Tab. 42:** ELISA-IgG in Abhängigkeit der NT-Titer.

NT (jeweils höchster Titer aus B1-B5)	ELISA (IgG)					
	negativ		grenzwertig		positiv	
	N	%	N	%	N	%
10 (N=37)	22	59,5	7	18,9	8	21,6
20 (N=53)	38	71,7	5	9,4	10	18,9
40 (N=93)	56	60,2	8	8,6	29	31,2
80 (N=159)	105	66,0	9	5,7	45	28,3
160 (N=101)	59	58,4	10	9,9	32	31,7
320 (N=65)	41	63,1	3	4,6	21	32,3
640 (N=3)	2	66,7	0	0,0	1	33,3
gesamt (N=511)	323	63,2	42	8,2	146	28,6

**Abb. 24:** ELISA-IgG in Abhängigkeit der NT-Titer.

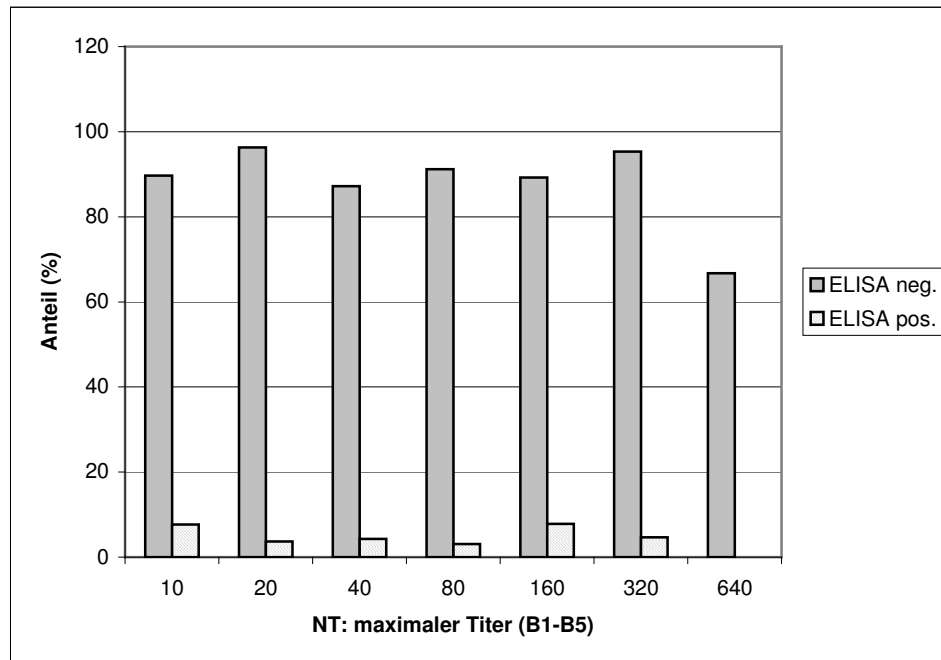
### 3.6.4 ELISA (IgM)

Wie beim ELISA-IgA konnte auch hier eine Abhängigkeit zwischen dem NT-Titer und den ELISA-Ergebnissen nicht gezeigt werden (Tab. 43 und Abb. 25).

**Tab. 43:** ELISA-IgM in Abhängigkeit der NT-Titer.

NT (jeweils höchster Titer aus B1-B5)	ELISA (IgM)					
	negativ		grenzwertig		positiv	
	N	%	N	%	N	%
10 (N=39)	35	89,7	1	2,6	3	7,7
20 (N=54)	52	96,3	0	0,0	2	3,7
40 (N=94)	82	87,2	8	8,5	4	4,3
80 (N=159)	145	91,2	9	5,7	5	3,1
160 (N=102)	91	89,2	3	2,9	8	7,8
320 (N=64)	61	95,3	0	0,0	3	4,7
640 (N=3)	2	66,7	1	33,3	0	0,0
gesamt (N=515)	468	90,9	22	4,3	25	4,9



**Abb. 25:** ELISA-IgM in Abhängigkeit der NT-Titer.

### 3.6.5 Einzelergebnisse im Vergleich

In der folgenden Tabelle sind alle positiven ELISA-Ergebnisse noch einmal im direkten Vergleich dargestellt. Es wird deutlich, dass sich im Wesentlichen keine Abhängigkeiten zwischen den prozentualen Anteilen der positiven ELISA-Werten und dem NT-Titer ergeben. Die positiven ELISA-Ergebnisse nehmen nicht in dem Maße zu, wie die Präzision im NT zunimmt bzw. wie der NT-Titer ansteigt. Die Erwartung, dass mit zunehmendem NT-Titer die Zahl der möglichen falsch positiven Ergebnisse im NT reduziert wird und deshalb gleichzeitig der Anteil der positiven Übereinstimmungen mit dem ELISA zunimmt, hat sich nicht erfüllt. Vielmehr zeigte sich, dass beim höchsten NT-Titer von 640 der Anteil der positiven ELISA-Ergebnisse deutlich verringert war, im Vergleich zum Titer von 160 und 320 (Tab. 44).

**Tab. 44:** Vergleich der positiven ELISA-Tests in Abhängigkeit vom NT-Titer.

NT (jeweils höchster Titer aus B1-B5)	IgA		IgG		IgM		gesamt*	
	N	%	N	%	N	%	N	%
10 (N=39)	2	5,1	8	20,5	3	7,7	13	33,3
20 (N=54)	3	5,6	10	18,5	2	3,7	14	25,9
40 (N=95)	3	3,2	29	30,5	4	4,2	33	35,1
80 (N=161)	5	3,1	45	28,0	5	3,1	50	31,4
160 (N=104)	10	9,6	32	30,8	8	7,7	40	39,2
320 (N=66)	4	6,1	21	31,8	3	4,5	24	36,9
640 (N=3)	0	0,0	1	33,3	0	0,0	1	33,3

\*IgA, IgG oder IgM positiv.

### 3.7 Sensitivität und Spezifität des ELISA-Tests

Um die Sensitivität und die Spezifität des ELISA-Tests zu ermitteln, wurde die Annahme zu Grunde gelegt, dass die Ergebnisse des Neutralisationstests (NT) den "wahren" Größen entsprechen. Ein positiver NT wurde demnach als sicher positives Ergebnis gewertet, ein negativer NT als ein sicher negatives Ergebnis. Auf der Basis dieser Hypothese wurde die Testempfindlichkeit des ELISA nach folgendem Muster berechnet:

	NT +	NT -
ELISA +	A	B
ELISA -	C	D

- Sensitivität =  $A / (A+C)$   
[Anteil der positiven ELISA-Ergebnisse an allen positiven NT-Ergebnissen]
- Spezifität =  $D / (B+D)$   
[Anteil der negativen ELISA-Ergebnisse an allen negativen NT-Ergebnissen]

#### 3.7.1 NT-Grenztiter = 80 als "wahre" Größe

Unter der Annahme, dass ein NT-Titer von mindestens 80 einem positiven Ergebnis entspricht bzw. ein NT-Titer kleiner 80 einem negativen Ergebnis, wurde die Empfindlichkeit des ELISA-Tests ermittelt, und zwar sowohl für die Virustypen im Einzelnen, als auch für die Virustypen insgesamt. Es sollte untersucht werden, ob in Abhängigkeit des Cox-B-Typen, der ELISA-Test unterschiedliche Empfindlichkeiten zeigt.

Wie aus den folgenden Tabellen ersichtlich ist, unterlagen weder die Sensitivität noch die Spezifität des ELISA-Tests größeren Schwankungen, im Hinblick auf die fünf Vi-

rustypen. Beim ELISA-IgG-Test fand sich mit 34,5% die höchste Sensitivität in Bezug auf die Cox-B4-Viren und die niedrigste Sensitivität mit 25,2% in Bezug auf die Cox-B2-Viren. Die Spezifität des ELISA-IgG-Tests schwankte nur geringfügig zwischen 62,4% und 63,4%, lediglich in Bezug auf die Cox-B2-Viren wich die Spezifität etwas deutlicher ab (85,7%). Bei Betrachtung des ELISA-Gesamtergebnisses (IgA, IgG, IgM) fand sich für die einzelnen Virustypen eine Sensitivität zwischen 32,4% und 37,5% bzw. eine Spezifität zwischen 54,7% und 55,2%.

In Bezug auf alle fünf Cox-B-Virustypen (B1-B5) wies der ELISA-IgG eine Sensitivität von 30,2% und eine Spezifität von 63,4% auf.

Bei Betrachtung des ELISA-Gesamtergebnisses (IgA, IgG und IgM) zeigte sich eine Sensitivität von 35,% und eine Spezifität von 56,7% (Tab. 45 und Tab. 46).

**Tab. 45:** Testempfindlichkeit des ELISA-IgG in Abhängigkeit der einzelnen Virustypen.

ELISA (IgG)	CoxB1	CoxB2	CoxB3	CoxB4	CoxB5	Cox (ges.)
Sensitivität (%)	29,2	25,2	30,8	31,1	34,5	30,2
Spezifität (%)	62,4	85,7	62,9	63,1	63,0	63,4

**Tab. 46:** Testempfindlichkeit des ELISA (gesamt) in Abhängigkeit der einzelnen Virustypen.

ELISA (gesamt)	CoxB1	CoxB2	CoxB3	CoxB4	CoxB5	Cox (ges.)
Sensitivität (%)	37,5	32,4	33,7	35,6	37,3	35,0
Spezifität (%)	54,7	55,1	55,0	55,1	55,2	56,7

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der ELISA-Test unter der Annahme, dass NT-Titer  $\geq 80$  positiv bzw. Titer  $< 80$  negativ sind, nur eine geringe Sensitivität aufwies. Sensitivität und Spezifität waren im Wesentlichen durch den Virustyp nicht beeinflusst.

Insgesamt betrug die Sensitivität des ELISA-Tests 35 Prozent, das heißt, nur 35 Prozent der mutmaßlich positiven Befunde konnten auch im ELISA bestätigt werden.

Die Spezifität des ELISA betrug 56,7 Prozent, was bedeutet, dass 56,7 Prozent der mutmaßlich negativen Befunde auch im ELISA bestätigt werden konnten (Tab. 46). Daraus folgt, dass 43,3 Prozent der ELISA-Tests falsch positiv oder grenzwertig waren.

### 3.7.2 Empfindlichkeit des ELISA in Abhängigkeit vom NT-Titer

Um zu prüfen, in welcher Weise die Empfindlichkeit des ELISA-Tests vom NT-Titer abhängt, wurde die Sensitivität und die Spezifität des ELISA unter Berücksichtigung verschiedener NT-Grenztiter bestimmt.

Wie aus den folgenden Tabellen ersichtlich ist, war sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des ELISA-Tests im Wesentlichen unabhängig vom NT-Titer. Weder fand sich mit steigendem NT-Titer eine zunehmende noch eine abnehmende Sensitivität oder Spezifität. Die Schwankungen der Ergebnisse bewegten sich fast ausnahmslos in einem relativ engen Rahmen (Tab. 47 und Tab. 48).

**Tab. 47:** Testempfindlichkeit des ELISA-IgG in Abhängigkeit vom NT-Grenztiter (NT gesamt: mind. einer der fünf Virustypen wies den entsprechenden Grenztiter auf).

ELISA (IgG)	NT-Titer mind. 10	NT-Titer mind. 20	NT-Titer mind. 40	NT-Titer mind. 80	NT-Titer mind. 160	NT-Titer mind. 320	NT-Titer mind. 640
Sensitivität (%)	28,6	28,1	30,4	30,2	32,0	32,4	**
Spezifität (%)	*	59,5	66,7	63,4	64,6	63,2	63,2

\*keine negativen NT-Tests beim Grenztiter von 10

\*\*nur 3 positive NT-Tests beim Grenztiter von 640

**Tab. 48:** Testempfindlichkeit des ELISA (gesamt) in Abhängigkeit vom NT-Grenztiter (NT gesamt: mind. einer der fünf Virustypen wies den entsprechenden Grenztiter auf).

ELISA (gesamt)	NT-Titer mind. 10	NT-Titer mind. 20	NT-Titer mind. 40	NT-Titer mind. 80	NT-Titer mind. 160	NT-Titer mind. 320	NT-Titer mind. 640
Sensitivität (%)	33,9	34,0	35,0	35,0	38,2	36,8	**
Spezifität (%)	*	46,2	58,1	56,7	56,6	55,4	55,8

\*keine negativen NT-Tests beim Grenztiter von 10

\*\*nur 3 positive NT-Tests beim Grenztiter von 640

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodik

Im Rahmen dieser Studie wurden mittels Neutralisationstest (NT) und ELISA-Test die Seren von Patienten untersucht, bei welchen die Verdachtsdiagnose einer Myokarditis gestellt worden war. Ziel der Untersuchung sollte es sein, beide Tests miteinander zu vergleichen. Es sollte vor allem festgestellt werden, ob der ELISA-Test den aufwändigeren NT ersetzen kann.

Aufgrund des Umstandes, dass von jedem Patienten lediglich eine Serumprobe vorlag, war es nicht möglich, eine akute Infektion sicher nachzuweisen oder auszuschließen. Zwar konnten bei vielen Patienten NT-Titer von 80 und höher gezeigt werden, die den Verdacht einer akuten Infektion nahe legen, jedoch diesen nicht beweisen können. Hierfür wären zeitversetzte Proben erforderlich, um Titeranstiege nachweisen zu können. Hohe AK-Titer im NT können auch Zeichen einer früher abgelaufenen Infektion sein. Andererseits können im NT auch Titer  $< 10$  eine Protektion gegen das betreffende Virus anzeigen.

Da von jedem Patienten nur eine Serumprobe vorlag und keine weiteren Daten verfügbar waren, die den Verdacht der akuten Erkrankung bestätigen oder ausschließen konnten, war es nicht das primäre Ziel dieser Studie, zu prüfen, inwiefern der NT oder der ELISA-Test eine Aussage im Hinblick auf die akute Infektion zulassen. Es war lediglich möglich bestimmte Hypothesen aufzustellen und zu prüfen, etwa die Annahme, dass hohe AK-Titer, wie zum Beispiel  $\geq 80$  oder  $\geq 160$ , eher einer akuten Infektion entsprechen. Auf dieser Basis konnte dann geprüft werden, in welchem Umfang mutmaßlich akute Infektionen sich auch im ELISA bestätigen lassen.

Beim Vergleich der beiden Testverfahren wurde im Wesentlichen davon ausgegangen, dass die Ergebnisse des NT spezifisch waren, im Hinblick auf eine abgelaufene oder

eine akute Infektion. Ein positiver NT wurde als "wahres" Ereignis interpretiert. Auf diese Weise konnten NT und ELISA-Test gut miteinander verglichen werden.

## 4.2 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Studie wurden die Serumproben von insgesamt 523 Patienten aller Altersgruppen untersucht, bei denen die Verdachtsdiagnose einer Myokarditis gestellt worden war. Bei 517 dieser Patienten wurden mittels ELISA die Coxsackievirus-AK (IgA, IgG und IgM) bestimmt. 175 von 517 Proben (33,8%) wiesen dabei ein positives Ergebnis auf. Die meisten Seren waren IgG-positiv (N=146; 28,5%). IgA-AK fanden sich bei 27 Proben (5,3%) und IgM-AK bei 25 Proben (4,8%).

Bei 522 der 523 vorliegenden Seren wurde ein Neutralisationstest (NT) durchgeführt, um B1-, B2-, B3-, B4- oder B5-AK nachweisen zu können. Hierbei fand sich bei 334 Patienten (64,0%) ein positiver Befund hinsichtlich eines oder mehrerer CBV-AK (AK-Titer  $\geq 80$ ). Der relativ hohe AK-Grenztiter von 80 wurde gewählt, um möglichst nur Patienten mit serologischen Hinweisen auf eine frische oder akute Infektion zu erfassen. Aufgrund der starken Durchseuchung wäre bei niedrigeren Titern ein zu hoher Anteil falsch positiver Ergebnisse zu erwarten gewesen. Tatsächlich wiesen auch alle untersuchten Seren bei mindestens einem der fünf CBV-AK einen Titer von 10 oder höher auf.

Die Tatsache, dass im ELISA nur 33,8 Prozent aller Seren einen positiven Befund aufwiesen, überrascht auf den ersten Blick etwas, wenn man den hohen Durchseuchungsgrad bei Enterovirus- oder Coxsackievirus-Infektionen berücksichtigt. Jedoch ist zu bedenken, dass das Testverfahren zur Diagnose akuter Infektionen konzipiert wurde. Dies bedeutet, dass man die Empfindlichkeit des Tests absichtlich vermindert hat. Dadurch werden zum Einen vor allem nur hohe AK-Titer erfasst und zum Anderen soll die Sensitivität gegenüber anderen Enteroviren vermindert werden. Tatsächlich überraschend war allerdings, dass sich bei nur 4,8 Prozent eindeutige Hinweise auf eine



akute Infektion in Form von positiven ELISA-IgM-Befunden fanden. Jedoch ist in diesem Zusammenhang zu bedenken, dass in der vorliegenden Studie keine Angaben zum zeitlichen Ablauf der Erkrankung und zum Zeitpunkt der Blutentnahme vorlagen. Es ist bekannt, dass IgM-AK sich erst einige Tage nach Krankheitsbeginn manifestieren. Dies könnte im vorliegenden Fall ein Grund für die eher geringen Anteile positiver IgM-Befunde gewesen sein.

Insgesamt fand sich im NT, bei einem zugrunde gelegten Grenztiter von 80, ein Anteil positiver Ergebnisse von 64 Prozent, im Gegensatz von nur 33,8 Prozent beim ELISA-Test.

Am häufigsten konnten im NT Cox-B4-AK nachgewiesen werden, nämlich bei 181 von 518 Seren (34,9%). Cox-B1-AK fanden sich bei 9,4 Prozent der untersuchten Seren, Cox-B2-AK bei 22,1 Prozent, Cox-B3-AK bei 20,5 Prozent und Cox-B5-AK bei 11,4 Prozent. Es kann jedoch aus diesen Zahlen weder abgeleitet werden, dass Cox-B4-Viren zu den häufigsten Coxsackie-B-Viren gehören, noch dass dieser Virentyp am häufigsten für eine CBV-Myokarditis verantwortlich ist. Vielmehr scheinen CBV-Infektionen zu verschiedenen Zeiten unterschiedlich häufig aufzutreten. Während zum Beispiel in den USA im Jahr 2000 CBV-5-Infektionen mit einem Anteil von 34,4 Prozent aller Non-Polio-Enterovirusinfektionen erfasst worden waren, lag deren Anteil ein Jahr später nur noch bei 1,7 Prozent (MMWR, 2002). Eine Untersuchung des Biopsiegewebes von 50 Patienten mit gesicherter Myokarditis lässt jedoch vermuten, dass Cox-B3-Viren möglicherweise eine der Hauptursachen der CBV-bedingten Myokarditis sein könnten (Nicholson et al. 1995).

Der Altersgruppenvergleich ließ beim ELISA-Test für die IgG-AK einen Abwärtstrend erkennen. So fanden sich in der jüngsten Gruppe (0-10 Jahre) mit einem Anteil von 41,7 Prozent die meisten positiven Befunde und bei den über 70-jährigen mit Anteilen von ca. 20 Prozent die wenigsten positiven Befunde. Für die IgA- und die IgM-AK war ein entsprechender Trend ebenfalls erkennbar, wenngleich auch nicht ganz so deutlich wie beim IgG, was allerdings an der eher geringen Anzahl positiver AK-Titer gelegen haben dürfte. Insgesamt spiegelten die Ergebnisse die Erfahrungen wider, dass CBV-Infektionen bereits sehr früh ablaufen und sich deshalb bei Kindern und Jugendlichen

eher positive Befunde finden lassen, da diese noch über höhere AK-Titer verfügen, als ältere Menschen (Moore et al. 1994; Stalkup und Chirukuri, 2002).

Dass die Anzahl der Patienten mit positiven IgG-ELISA-AK mit zunehmendem Alter abnimmt, dürfte vermutlich am ehesten dadurch zu erklären sein, dass die Immunität im Alter abnimmt. Es ist anzunehmen, dass nach der, meist in jungen Jahren abgelaufenen Infektion, die AK-Titer im Laufe der Jahre langsam absinken. Eine andere Erklärung wäre, dass die Mortalitätsrate bei Patienten nach abgelaufener Infektion höher ist. Schließlich wäre auch denkbar, dass mit zunehmendem Alter die Exposition mit Coxsackie-Viren abnimmt und aus diesem Grund bei älteren Patienten seltener positive AK-Titer gefunden werden.

Die Tatsache, dass in unserer Untersuchung der Anteil der Patienten mit positiven IgM- und IgA-ELISA-AK relativ gering war, erklärt sich dadurch, dass eine hohe Durchseuchungsrate vorliegt und deshalb eine Immunität besteht, die vor akuten Infektionen schützt. Wie gezeigt werden konnte, weisen mit Eintritt ins Erwachsenenalter bereits ca. 80 Prozent der Bevölkerung Antikörper gegen mindestens einen CBV-Serotypen auf (Steinmann und Ullmann, 1981).

Beim NT konnte im Altergruppenvergleich im Wesentlichen kein Trend gezeigt werden. In allen Altergruppen, mit Ausnahme der über 80-jährigen, lag der Anteil positiver Befunde zwischen ca. 60 und 70 Prozent (pos. Befund: mind. einer der 5 AK-Titer  $\geq$  80). Der Trend, wie er in der Allgemeinbevölkerung zu erwarten wäre, und wie er auch im ELISA-Test gezeigt werden konnte, ließ sich im NT nicht bestätigen. Es sollte jedoch bei der Interpretation berücksichtigt werden, dass diese Studie nicht mit einem normalen Bevölkerungsquerschnitt verglichen werden kann, weil bei den Patienten der Verdacht einer Virusmyokarditis bestand. Das Patientengut kann also keinesfalls als repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung betrachtet werden. Vielmehr konnte aufgrund der Patientenselektion in dieser Studie ein eher hoher Anteil positiver Befunde erwartet werden. Mit einer altersabhängigen Abnahme der positiven Befunde war grundsätzlich nicht zu rechnen.

Ginge man davon aus, dass AK-Titer von 80 oder höher, im NT mit einer akuten Erkrankung korrelieren, so wären die vorliegenden Ergebnisse nicht in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur, wo man davon ausgeht, dass eine CBV-Myokarditis häufig im Alter von 20 bis 40 Jahren auftritt (Woodruff, 1980).

Auffällig war beim ELISA-Test, dass die Seren weiblicher Patienten mit einem Anteil von 40,3 Prozent signifikant häufiger einen positiven Befund (IgA, IgG oder IgM) aufwiesen, als die Seren der männlichen Patienten mit 30,2 Prozent ( $p < 0,05$ ). Die Unterschiede waren insbesondere bei den jüngeren Altersgruppen sehr ausgeprägt. IgM-AK konnten bei den weiblichen Patienten mit einem Anteil von 7,0 Prozent fast doppelt so häufig nachgewiesen werden wie bei den männlichen, mit einem Anteil von nur 3,7 Prozent. Vermutlich aufgrund der insgesamt eher geringen Anzahl positiver Seren war diese Differenz allerdings statistisch nicht signifikant.

Im NT konnten geschlechtsspezifische Unterschiede im Wesentlichen nicht gezeigt werden. Hier fand sich bei den weiblichen Patienten ein Anteil positiver Befunde von 68,1 Prozent und bei den männlichen Patienten ein etwas geringerer Anteil von 61,7 Prozent (pos. Befund: mind. einer der 5 AK-Titer  $\geq 80$ ). Die Differenz war statistisch nicht signifikant. Da bisher bei den Enterovirus- bzw. den CBV-Infektionen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bekannt geworden sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse des NT eher der Realität entsprechen, als jene des ELISA-Tests. Warum beim ELISA-Test geschlechtsspezifische Differenzen beobachtet wurden, bleibt fraglich.

Wie weiter oben bereits ausgeführt wiesen im NT, mit einem Anteil von 64 Prozent, deutlich mehr Patienten einen positiven Befund auf, als im ELISA-Test mit einem Anteil von 33,8 Prozent. Beim direkten Vergleich der beiden Testverfahren zeigte sich, dass sich unter den 329 Seren mit positivem Befund im NT nur 115 befanden, die auch im ELISA-Test positiv waren. Dies entsprach einem Anteil von 35,0 Prozent. 55 Prozent der NT-positiven Seren wiesen im ELISA-Test ein negatives und 10 Prozent ein grenzwertiges Ergebnis auf. Die Übereinstimmung der beiden Testverfahren war aus Sicht des NT also relativ gering. Dafür zeigte sich eine größere Übereinstimmung der

Ergebnisse aus Sicht des ELISA-Tests. Unter den 175 positiven ELISA-Befunden fanden sich immerhin 115 positive NT-Befunde, was einem Anteil von 65,7 Prozent entsprach. Insgesamt zeigten sich bei 42,8 Prozent der untersuchten Seren positive oder negative Übereinstimmungen, das heißt beide Tests wiesen entweder gleichzeitig ein positives oder ein negatives Ergebnis auf. Bei fast 50 Prozent waren die Ergebnisse divergent, das heißt im einen Test positiv und gleichzeitig im anderen Test negativ oder umgekehrt. Bei etwa 10 Prozent der Seren wies der ELISA-Test ein grenzwertiges Ergebnis auf.

Um zu prüfen, welchen Einfluss der NT-Titer auf den Vergleich der beiden Testverfahren hat, wurde der Grenztiter von 80 auf 160 angehoben, um mit den daraus resultierenden Daten eine erneute Berechnung anzustellen. Als positiv galten nunmehr also alle NT-Befunde mit einem Titer von 160 oder höher. Aufgrund der Anhebung des Grenztiters sank der Anteil positiver Seren im NT auf 33,1 Prozent ab und war damit fast identisch mit dem ELISA-Ergebnis, welches einen positiven Anteil von 33,8 Prozent aufwies. Die Vermutung, dass sich dadurch auch der Grad der Übereinstimmungen zwischen NT und ELISA-Test erhöhen könnte, bestätigte sich allerdings nicht. Der Anteil der positiven ELISA-Befunden an den positiven NT-Befunden erhöhte sich lediglich von 35,0 auf 38,2 Prozent. Umgekehrt waren von den positiven ELISA-Befunden jetzt nur noch 37,1 Prozent auch im NT positiv (zuvor 65,7%). Der Anteil der positiven und negativen Übereinstimmungen erhöhte sich von ca. 40 auf 50 Prozent, wobei sich der Anteil der positiven Übereinstimmungen zu Gunsten der negativen Übereinstimmungen deutlich vermindert hatte (12,6% vs. 22,3%).

Um den Einfluss aller NT-Grenztiter zwischen 20 und 320 auf den ELISA-Test zu prüfen, wurden die Anteile der positiven ELISA-Befunde an den jeweiligen positiven NT-Befunden ermittelt. Es zeigte sich, dass unabhängig vom NT-Grenzwert dieser Anteil immer ca. 35 Prozent betrug (34,0 - 36,8%). Dies bedeutet, dass unabhängig vom NT-Grenzwert, der Anteil der seropositiven ELISA-Proben in unserem Kollektiv bei etwa einem Drittel lag. Dies lässt vermuten, dass zwischen dem NT und dem ELISA-Test quasi keine Korrelation bestand. Die Vermutung, dass beim ELISA-Test deshalb weniger seropositive Befunde gefunden wurden, weil dieser möglicherweise weniger

sensitiv ist bzw. erst bei höheren AK-Titern positiv wird, bestätigte sich nicht. Es erscheint überraschend, dass der Anteil positiver ELISA-Befunde nicht mit steigendem NT-Titer zunahm. Legt man die Ergebnisse des NT als "wahre" Größe zu Grunde, was aufgrund der Spezifität auch sicherlich zulässig sein dürfte, so lässt dies nur den Schluss zu, dass der ELISA-Test im Hinblick auf CBV-Infektionen nur eine geringe Präzision aufweist und dass ferner so gut wie keine Korrelation mit den CBV-AK besteht.

Um die Sensitivität und die Spezifität des ELISA-Tests für die einzelnen CBV-Typen zu prüfen wurden die Anteile positiver ELISA-Befunde an den jeweiligen positiven NT-Befunden (Sensitivität) sowie die Anteile negativer ELISA-Befunde an den jeweiligen negativen NT-Befunden (Spezifität) ermittelt. Wiederum wurde zunächst als positiver NT-Befund ein Titer von 80 oder höher zugrunde gelegt. Hierbei zeigte sich hinsichtlich aller CBV-Typen sowohl eine ähnliche Sensitivität als auch eine ähnliche Spezifität. Die Sensitivität schwankte in Abhängigkeit vom Virustyp geringfügig zwischen 33,7 und 37,5 Prozent. Bei der Spezifität lagen die Anteile zwischen 54,7 und 56,7 Prozent. Der ELISA-Test wies also für keinen der fünf Virentypen eine besondere Empfindlichkeit auf. Dies erscheint insofern überraschend, als dass, in Anlehnung an die internationale Literatur, beim vorliegenden ELISA-Test Antigenpräparationen der CBV-B1 und CBV-B5 Anwendung finden (Bomann et al. 1992; Swanink et al. 1993). Zwar wurde hierbei, um eine möglichst große Reaktivität mit den anderen CBV-Typen zu erreichen, das kreuzreaktive H-Antigen verwendet, welches denaturierte Virionen und leere Viruskapside enthält (Reigel et al. 1985), dennoch wäre zu erwarten gewesen, dass die beiden Typen B1 und B5 häufiger nachgewiesen werden. Dass dem in unserer Studie nicht so war, spricht zunächst einmal für die Ausgewogenheit des ELISA-Tests im Hinblick auf alle CBV-Typen.

Um schließlich zu prüfen, in welcher Weise die Präzision des ELISA-Tests vom NT-Titer abhängt, wurden die Sensitivität und die Spezifität des ELISA unter Berücksichtigung verschiedener NT-Titer ermittelt. Hierbei ergab sich, dass in Analogie zu den weiter oben bereits beschriebenen Beobachtungen, weder die Sensitivität noch die Spezifität des ELISA-Tests eine Abhängigkeit vom NT-Titer zeigten. Unabhängig vom NT-Titer schwankte die Sensitivität des ELISA-Tests zwischen 33,9 und 38,2 Prozent

und die Spezifität zwischen 46,2 und 58,1 Prozent. Es bestätigte sich auch hier, dass im Wesentlichen keine Korrelation zwischen dem NT bzw. den NT-Titern und dem ELISA-Test bestand.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der ELISA-Test nur bedingt geeignet ist, um CBV-Infektionen (akut oder abgelaufen) nachzuweisen. Unter Annahme des NT als "wahrer" Größe wies der ELISA-Test nur eine geringe Sensitivität auf. Gut zwei Drittel aller putativ positiven Befunde wurden mittels ELISA-Test nicht erkannt, und zwar unabhängig vom NT-Titer. Es bestand keine Korrelation zwischen dem NT bzw. den NT-Titern und dem ELISA-Test. Der ELISA-Test erscheint nicht geeignet, um den NT zu ersetzen.

## 5 Zusammenfassung

Enterovirus- bzw. CBV-Infektionen können eine Vielzahl klinischer Symptome hervorrufen, wobei in der Regel allenfalls eine Verdachtsdiagnose gestellt werden kann. Um unnötige Behandlungen und Untersuchungen zu vermeiden, kann es notwendig sein, eine genaue Diagnose stellen zu müssen. Dies gilt insbesondere für schwerwiegende Krankheitsverläufe oder Erkrankungen bei Neugeborenen, bei welchen CBV-Infektionen nicht selten einen fulminanten Verlauf zeigen.

Für die Diagnostik stehen zwei grundsätzliche Verfahren zur Verfügung, nämlich der direkte Nachweis der Viren, etwa durch die Anzüchtung der Viren und die anschließende Spezifizierung, oder der indirekte Nachweis durch Bestimmung von Antikörpern.

In unserer Studie wurden, als indirekte Nachweisverfahren, der Neutralisationstest (NT) und der ELISA-Test bei den Seren von insgesamt 523 Patienten angewandt, bei denen die Verdachtsdiagnose einer Myokarditis gestellt worden war. Ziel der Untersuchung war es, die beiden Testverfahren miteinander zu vergleichen, um zu zeigen, inwiefern der ELISA-Test den NT ersetzen kann. Dabei wurden verschiedene NT-Grenztiter als mutmaßlich positive Befunde zugrunde gelegt. Ferner sollte versucht werden, den Anteil der mutmaßlich akuten Erkrankungen zu ermitteln. Hierbei sollten auch Alters- und Geschlechterverteilung sowie die Häufigkeit der einzelnen CBV-Typen berücksichtigt werden.

Um möglichst nur Patienten mit serologischen Hinweisen auf eine frische oder aktive Infektion zu erfassen, wurde für den NT ein Grenztiter von 80 festgelegt. Dabei fand sich ein Anteil positiver Befunde von 64,0 Prozent. Im ELISA-Test fand sich ein Anteil positiver Befunde von 33,8 Prozent (IgG-positiv waren dabei 28,5%).

Am häufigsten fanden sich AK gegen Cox-B4 (34,9%), gefolgt von Cox-B2 (22,1%), Cox-B3 (20,5%), Cox-B-5 (11,5%) und Cox-B1 (9,4%).

Eine Abhängigkeit von einzelnen Altersgruppen ergab sich beim NT nicht. Beim ELISA-Test nahm die Zahl positiver Seren mit zunehmendem Alter ab.

Geschlechtsspezifische Unterschiede konnten beim NT nicht gezeigt werden. Beim ELISA-Test hatten Frauen signifikant häufiger positive Befunde als Männer (40,3 vs. 30,2%;  $p < 0,05$ ).

Unter Annahme der Ergebnisse des NT als "wahre" Größe (positives Ergebnis = wirklich positiver Befund) wies der ELISA-Test nur eine geringe Sensitivität auf, die in Abhängigkeit vom NT-Grenzwert zwischen 33,9 und 38,2 Prozent schwankte. Eine Zunahme der Sensitivität mit steigendem NT-Grenzwert konnte nicht gezeigt werden. Die Spezifität schwankte zwischen 46,2 und 58,1 Prozent und korrelierte ebenfalls nicht mit dem NT-Grenzwert. Es konnte festgestellt werden, dass der ELISA-Test nur bedingt geeignet ist, um akute oder abgelaufene CBV-Infektionen nachzuweisen. Eine Korrelation zwischen dem ELISA-Test und dem NT lag nicht vor. Der ELISA-Test scheint aufgrund der Ergebnisse nicht geeignet, um den NT zu ersetzen.



## 6 Literaturverzeichnis

Abzug MJ. Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr Drugs*. 2004;6(1):1-10.

Alksnis M, Lindberg M, Stalhandske P, Hultberg H, Pettersson U. Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for type-specific identification of coxsackie B viruses. *Mol Cell Probes*. 1989 Jun;3(2):103-8.

Archard LC, Richardson PJ, Olsen EG, Dubowitz V, Sewry C, Bowles NE. The role of Coxsackie B viruses in the pathogenesis of myocarditis, dilated cardiomyopathy and inflammatory muscle disease. *Biochem Soc Symp*. 1987;53:51-62.

Assaad F, Borecka I. Nine-year study of WHO virus reports on fatal viral infections. *Bull World Health Organ*. 1977;55(4):445-53.

Assaad F, Cockburn WC. Four-year study of WHO virus reports on enteroviruses other than poliovirus. *Bull World Health Organ*. 1972;46(3):329-36.

Basso NG, Fonseca ME, Garcia AG, Zuardi JA, Silva MR, Outani H. Enterovirus isolation from foetal and placental tissues. *Acta Virol*. 1990 Feb;34(1):49-57.

Berlin LE, Rorabaugh ML, Heldrich F, Roberts K, Doran T, Modlin JF. Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis*. 1993 Oct;168(4):888-92.

Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, Archard LC. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1986 May 17;1(8490):1120-3.

Buxbaum S, Berger A, Preiser W, Rabenau HF, Doerr HW. Enterovirus infections in Germany: comparative evaluation of different laboratory diagnostic methods. *Infection*. 2001 May-Jun;29(3):138-42.

Champsaur H, Fattal-German M, Arranhado R. Sensitivity and specificity of viral immunoglobulin M determination by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1988 Feb;26(2):328-32.

Chatterjee NK, Tuchowski C. Comparison of capsid polypeptides of group B coxsackieviruses and polypeptide synthesis in infected cells. *Arch Virol*. 1981;70(3):255-69.

Chonmaitree T, Baldwin CD, Lucia HL. Role of the virology laboratory in diagnosis and management of patients with central nervous system disease. *Clin Microbiol Rev*. 1989 Jan;2(1):1-14.

Dalldorf G, Sickles GM. An unidentified filterable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science* 1948 (108):61-62

Dalldorf G, Sickles GM, Plager H, Gifford R. A virus recovered from the faeces of „poliomyelitis“ patients. Pathogenic for suckling mice. *Journal of Experimental Medicine*. 1949;89:567-582

del Rosario Zuniga M, Reichardt J, Braun W, Weber B, Doerr HW. Detection of IgM antibodies against coxsackie B viruses by a western blot technique. *Acta Virol*. 1993 Feb;37(1):1-10.

Doerr HW: Neutralisierende Coxsackie-Virus-B-Antikörper bei Myokarditis und Pleurodynie. *DMW* 1973;29:1396–1400.

Dörries R, Ter Meulen V. Specificity of IgM antibodies in acute human coxsackievirus B infections, analyzed by indirect solid phase enzyme immunoassay and immunoblot technique. J Gen Virol 1983;64:159-67.

Dörries R. Spezielle Virologie - Picornaviridae. In Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie. 2. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart 2002;146-54.

Dunker AK, Rueckert RR. Fragments generated by pH dissociation of ME-virus and their relation to the structure of the virion. J Mol Biol. 1971 May 28;58(1):217-35.

Eggers HJ, Mertens T. Persistence of Coxsackie B virus-specific IgM. Lancet. 1986 Aug 2;2(8501):284.

Grandien M, Olding-Stenkvist E. Rapid diagnosis of viral infections in the central nervous system. Scand J Infect Dis. 1984;16(1):1-8.

Grist NR, Bell EJ. Coxsackie viruses and the heart. Am Heart J. 1969 Mar;77(3):295-300.

Grist NR, Bell EJ, Assaad F. Enteroviruses in human disease. Prog Med Virol. 1978;24:114-57.

Hengstenberg C, Rose ML, Olsen EG, Maisch B. Immune response to the endothelium in myocarditis, dilated cardiomyopathy and rejection after heart transplantation. Eur Heart J. 1991 Aug;12 Suppl D:144-6.

Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. J Gen Virol. 1997 Jan;78 ( Pt 1):1-11.

Kandolf R, Canu A, Hofschneider PH. Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon. *J Mol Cell Cardiol.* 1985a Feb;17(2):167-81.

Kandolf R, Hofschneider PH. Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Coxsackie B3 virus: full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985b Jul;82(14):4818-22.

Kandolf R, Ameis D, Kirschner P, Canu A, Hofschneider PH. In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: an approach to the diagnosis of viral heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Sep;84(17):6272-6.

Kandolf R, Hofschneider PH. Viral heart disease. *Springer Semin Immunopathol.* 1989;11(1):1-13.

Katze MG, Crowell RL. Immunological studies of the group B coxsackieviruses by the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoprecipitation. *J Gen Virol.* 1980 Oct;50(2):357-67.

Kimmig P, Fleischer J. Wie gut ist unser Wasser? 8. Ernährungsfachtagung der DGE-Sektion BaWü am 09. Oktober 2001. <http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/ernaehrung/lebensmittel/waren/getraenke/wasser/Kimmig.pdf>

Kühl U, Daun B, Seeberg B, Schultheiss HP, Strauer BE. [Dilated cardiomyopathy--a chronic myocarditis? Immunohistological characterization of lymphocytic infiltrates] *Herz.* 1992 Apr;17(2):97-106.

Kuhn RJ. Identification and biology of cellular receptors for the coxsackie B viruses group. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1997;223:209-26.

- Lennette EH, Shinomoto TT, Schmidt NJ, Magoffin RL. Observations on the neutralizing antibody response to group B Cocksackie viruses in patients with central nervous system disease. *J Immunol.* 1961 Mar;86:257-66.
- Lerner, A. M., F. M. Wilson, and M. P. Reyes. Enteroviruses and the heart (with special emphasis on the probable role of coxsackieviruses, group B, types 1–5). *Modern Concepts Cardiovasc. Dis.* 1975; 44:11.
- Leslie K, Blay R, Haisch C, Lodge A, Weller A, Huber S. Clinical and experimental aspects of viral myocarditis. *Clin Microbiol Rev.* 1989 Apr;2(2):191-203.
- Lim KA, Benyesh-Melnick M. Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Cocksackie and ECHO). *J Immunol.* 1960 Mar;84:309-17.
- Maisch B. Immunologic regulator and effector functions in perimyocarditis, postmyocarditic heart muscle disease and dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 1986;81 Suppl 1:217-41.
- Maisch B, Bauer E, Cirsi M, Kochsiek K. Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterization and pathogenetic relevance. *Circulation.* 1993 May;87(5 Suppl):IV49-65
- Maisch B, Schonian U, Crombach M, Wendl I, Bethge C, Herzum M, Klein HH. Cytomegalovirus associated inflammatory heart muscle disease. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1993;88:135-48.
- Maisch B, Ristic AD, Hufnagel G, Pankuweit S. Pathophysiology of viral myocarditis: the role of humoral immune response. *Cardiovasc Pathol.* 2002 Mar-Apr;11(2):112-22.

- Maisch B, Ristic AD, Portig I, Pankuweit S. Human viral cardiomyopathy. *Front Biosci.* 2003 Jan 1;8:s39-67.
- Martin AB, Webber S, Fricker FJ, Jaffe R, Demmler G, Kearney D, Zhang YH, Bodurtha J, Gelb B, Ni J, et al. Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation.* 1994 Jul;90(1):330-9.
- Melnick J. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knippe DM, Howley PM, et al, eds. *Fields virology.* 3rd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven Publishers, 1996:655-712.
- Mertens, T. H., U. Pika, and H. J. Eggers. Cross antigenicity among enteroviruses as revealed by immunoblot technique. *Virology* 1983;129:431-442.
- Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:461-87.
- Minor, P.D., Brown, F., Domingo, E., Hoey, E., King, A., Knowles, N., Lemon, S., Palmenberg, A., Rueckert, R.R., Stanway, G., Wimmer, E. and Yin-Murphy, M. 1995 Picornaviridae. *Arch. Virol.* 1995;Suppl. 10:329-336.
- MMWR Morb. Mortal Wkly Rep. (kein Author angegeben). Enterovirus surveillance--United States, 2000-2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002 Nov 22;51(46):1047-49.
- Moore M, Kaplan MH, McPhee J, Bregman DJ, Klein SW. Epidemiologic, clinical, and laboratory features of Coxsackie B1-B5 infections in the United States, 1970-79. *Public Health Rep.* 1984 Sep-Oct;99(5):515-22.

Muir P, Kammerer U, Korn K, Mulders MN, Poyry T, Weissbrich B, Kandolf R, Cleator GM, van Loon AM. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan;11(1):202-27.

Murray BJ. Complications following coxsackievirus B infection. Am Fam Physician. 1988 Nov;38(5):115-8.

Nicholson F, Ajetunmobi JF, Li M, Shackleton EA, Starkey WG, Illavia SJ, Muir P, Banatvala JE. Molecular detection and serotypic analysis of enterovirus RNA in archival specimens from patients with acute myocarditis. Br Heart J. 1995 Nov;74(5):522-7.

Pallansch MA, Roos RP. Enterovirus: Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus and newer enteroviruses In: Fields BN, Knipe DM et al. Virology. 4th Edt.. New York: Raven Press; 2001. 723-775.

Pankuweit S, Portig I, Lottspeich F, Maisch B. Autoantibodies in sera of patients with myocarditis: characterization of the corresponding proteins by isoelectric focusing and N-terminal sequence analysis. J Mol Cell Cardiol. 1997 Jan;29(1):77-84.

Pankuweit S, Portig I, Eckhardt H, Crombach M, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of viral genome in endomyocardial biopsies from patients with inflammatory heart muscle disease. Herz. 2000 May;25(3):221-6.

Pankuweit S, Portig I, Maisch B. Pathophysiology of cardiac inflammation: molecular mechanisms. Herz. 2002 Nov;27(7):669-76.

Philipson L, Beatrice ST, Crowell RL. A structural model for picornaviruses as suggested from an analysis of urea-degraded virions and procapsids of coxsackievirus B3. Virology. 1973 Jul;54(1):69-79.

- Pohlner K, Portig I, Pankuweit S, Lottspeich F, Maisch B. Identification of mitochondrial antigens recognized by antibodies in sera of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing. *Am J Cardiol.* 1997 Oct 15;80(8):1040-5.
- Putnak, J. R. & Phillips, B. A. Picornaviral structure and assembly. *Microbiological Reviews* 1981; 45:287–315.
- Racaniello VR. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM et al. *Virology*. 4th Edt.. New York: Raven Press; 2001. 685-722.
- Ramsingh A, Hixson A, Duceman B, Slack J. Evidence suggesting that virulence maps to the P1 region of the coxsackievirus B4 genome. *J Virol.* 1990 Jun;64(6):3078-81.
- Rotbart HA. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):438-42.
- Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis.* 1995 Apr;20(4):971-81.
- Rotbart HA, Hayden FG. Picornavirus infections: a primer for the practitioner. *Arch Fam Med.* 2000 Sep-Oct;9(9):913-20.
- Rueckert RR. Picornaviridae and Their Replication. *Virology*. Second Edition, edited by B.N. Fields, D.M. Knipe et al. Raven Press, Ltd., New-York - 1990
- Santi J, Harvala H, Kinnunen L, Hyypia T. Molecular epidemiology and evolution of coxsackievirus A9. *J Gen Virol.* 2000 May;81(Pt 5):1361-72.
- Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2002 Jan;13(1):40-7.



Stalkup JR, Chilukuri S. Enterovirus infections: a review of clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Dermatol Clin*. 2002 Apr;20(2):217-23.

Steinmann J, Ullmann U. Viruserkrankungen des zentralen Nervensystems. *Med Klin*. 1981 Oct 9;76(21):582-6.

Tracy S, Latham A. Rapid identification of coxsackie B viruses after immunoprecipitation and nucleic acid hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1986 Apr;4(4):327-33.

van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, eds, 2000. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Academic Press 2000.

Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol*. 1980 Nov;101(2):425-84.

Yolken RH, Torsch VM. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection and identification of coxsackieviruses A. *Infect Immun*. 1981 Feb;31(2):742-50.

Yolken RH, Torsch V. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and identification of coxsackie B antigen in tissue cultures and clinical specimens. *J Med Virol*. 1980;6(1):45-52.

Zhang T, Ma G, Ma L. [Study on specificity of IgM antibody response in patients with coxsackie virus B infection] *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2001 Mar;15(1):66-8.

## 7 Anhang

### 7.1 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die nachfolgenden Damen und Herren:

Aumüller	Holzheidt	Schürmann
Austermann	Kern	Schulte
Beato	Koch	Schumacher
Bruchmann	Koolmann	Seifart
Coca	Katschinski	Siegel
Dibbets	Lang	Stachniss
Feuser	Lehmann	Steiniger
Flores de Jacoby	Lammel	Stelzel
Gente	Lotzmann	Stoll
Geus	Mengel	Umstadt
Gloerfeld	Mittag	Wenz
Habermehl	Pieper	Werner
Hardy	Radsak	Wolf
Hasilik	Ramaswamy	Vogel
Hochban	Salomon	Voigt
Jungclas	Schachtschabel	Zelder

## **7.2 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Werner Slenczka danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas, seine Zeit und sein Engagement bei der gemeinsamen Beschäftigung mit dem Thema.

Besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Virologie, insbesondere Frau Annette Syrotek für die Hilfestellungen bei den Neutralisationstests und Frau Kirsten Volland für die technische Unterstützung sowie die vielen Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich bei der Firma Virion-Serion für die Bereitstellung der Testkits bedanken.

Ich bedanke mich bei meiner Frau Saideh und meinen Kindern Nick und Ava, die mich auch in Zeiten, in denen nicht alles nach meinen Wünschen lief, stets unterstützt und ermutigt hatten.

Ferner danke ich meinen Eltern und Geschwistern, vor allem meinem älteren Bruder REZA, der immer an mich geglaubt hat und stets ein offenes Ohr für all meine Belange hatte.

Ein großes Dankeschön auch allen anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Alireza, Varesch, Massi, Manoochehr, Arya, Artin, Kave, Mehri, Said, Mahbubeh, Shahryar und Shahrzad und die Familie Farhan, dafür, dass sie mich während meiner gesamten Ausbildung und auch bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten.